

**POLIPLOIDISASI ANGGREK *Vanda lombokensis* J. J. Sm.
MENGUNAKAN KOLKISIN SECARA *IN VIVO***

Oleh
MEI MASRUROH



**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERTANIAN
MALANG**

2018

**POLIPLOIDISASI ANGGREK *Vanda lumbokensis* J. J. Sm.
MENGUNAKAN KOLKISIN SECARA *IN VIVO***

Oleh

**MEI MASRUOH
145040201111038**

**PROGRAM STUDI AGROEKOTEKNOLOGI
MINAT BUDIDAYA PERTANIAN**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh Gelar Sarjana Pertanian
Strata Satu (S-1)**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERTANIAN
JURUSAN BUDIDAYA PERTANIAN
MALANG**

2018

PERNYATAAN

Saya menyampaikan bahwa segala pernyataan dalam skripsi ini merupakan hasil penelitian saya sendiri, dengan bimbingan dosen pembimbing. Skripsi ini tidak pernah diajukan untuk memperoleh gelar di perguruan tinggi manapun dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang dengan jelas ditunjukkan rujukannya dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Malang, Agustus 2018

Mei Masruroh



LEMBAR PERSETUJUAN

Judul Penelitian : **Poliploidisasi Anggrek *Vanda lombokensis* J. J. Sm.
Menggunakan Kolkisin secara *In Vivo***


Nama Mahasiswa : Mei Masruroh

NIM : 145040201111038

Minat : Budidaya Pertanian

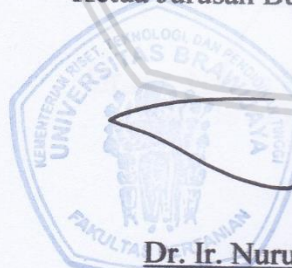
Program Studi : Agroekoteknologi

Disetujui,
Pembimbing Utama



Prof. Dr. Ir. Lita Soetopo
NIP. 195104081979032001

Diketahui,
Ketua Jurusan Budidaya Pertanian



Dr. Ir. Nurul Aini, MS
NIP. 196010121986012001

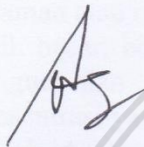
Tanggal Persetujuan:

LEMBAR PENGESAHAN

Mengesahkan,

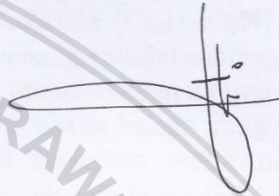
MAJELIS PENGUJI

Penguji I



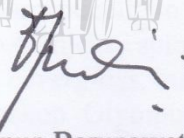
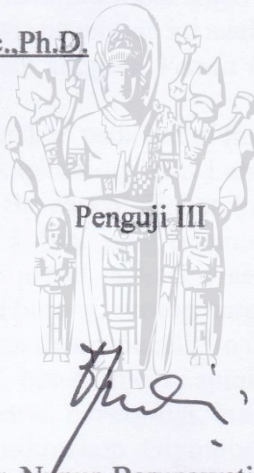
Ir. Arifin Noor Sugiharto, M.Sc., Ph.D.
NIP. 196204171987011002

Penguji II



Prof. Dr. Ir. Lita Soetopo
NIP. 195104081979032001

Penguji III



Dr. agr. Nunun Barunawati, SP., MP.
NIP. 1974072420050120001

Tanggal Lulus :

20 SEP 2018

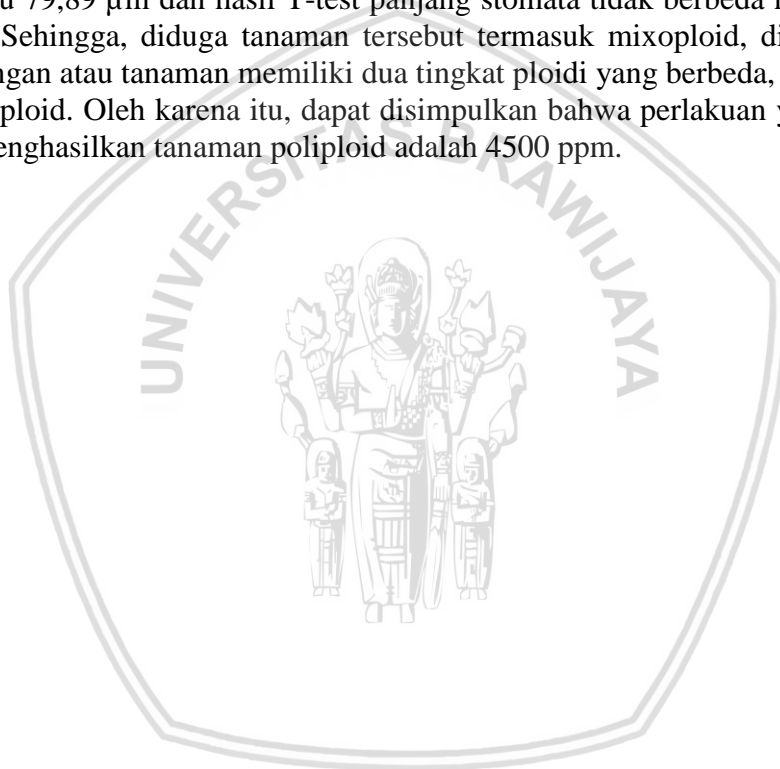
RINGKASAN

MEI MASRUROH. 145040201111038. Poliploidisasi Anggrek *Vanda lombokensis* J. J. Sm. Menggunakan Kolkisin secara *In Vivo*. Di bawah bimbingan Prof. Dr.Ir. Lita Soetopo.

Anggrek merupakan salah satu jenis tanaman hias yang populer dan banyak diminati karena bentuk serta motif bunganya yang menarik. Diperkirakan terdapat kurang lebih 5000 spesies tersebar di hutan-hutan seluruh Indonesia dari Sumatera hingga Papua. Salah satu jenis anggrek asli Indonesia yang memiliki bunga yang menarik adalah anggrek *Vanda lombokensis* J. J. Sm. Anggrek *Vanda lombokensis* J. J. Sm. memiliki potensi untuk dikembangkan, mengingat masih belum banyak penelitian tentang anggrek *Vanda* terutama di Indonesia. Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk mengembangkan potensi anggrek *Vanda* adalah dengan menggunakan mutagen, sehingga didapatkan variasi lain dari anggrek *Vanda* seperti *Vanda* poliploid. Salah satu mutagen yang biasanya digunakan dalam kegiatan pemuliaan tanaman adalah kolkisin. Kolkisin ($C_{22}H_{25}O_6N$) merupakan alkaloid yang dapat menghambat terbentuknya benang spindel sehingga terbentuk tanaman atau individu poliploid. Poliploidi dapat menghasilkan ukuran bunga yang lebih besar, bentuk bunga yang lebih bulat, dan warna bunga yang lebih pekat (Miguel dan Leonhardt, 2011). Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi yang efektif untuk menghasilkan anggrek *Vanda lombokensis* J. J. Sm. poliploid secara *in vivo*. Hipotesis penelitian ini adalah terdapat konsentrasi kolkisin yang efektif untuk menghasilkan anggrek *Vanda lombokensis* J. J. Sm. poliploid secara *in vivo*.

Penelitian telah dilaksanakan pada bulan Januari-Juli 2018 di CV Soerjanto Orchid Batu, Laboratorium Bioteknologi, dan Laboratorium Pemuliaan Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya. Bahan yang digunakan antara lain bibit anggrek *Vanda lombokensis* J. J. Sm. yang berumur 3 bulan setelah aklimatisasi, bambu, etanol, kolkisin, asam asetat, aquades, aceto orcein, HCL 1 N, spiritus, hidroksiquinolin, tisu, cat kuku bening, sarung tangan, injeksi spuit 1 mL, masker, kertas label. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Pantone Color Chart*, tray, penggaris, bambu, botol, injeksi spuit 1 mL, plastik, tali, alat tulis, kamera, pipet, pinset, kaca peparat, *coverglass*, bunsen, tube, jangka sorong, gelas arloji, *waterbath*, silet, dan mikroskop Olympus. Penelitian ini menggunakan perlakuan konsentrasi kolkisin sebanyak lima perlakuan, yaitu 0 ppm (kontrol), 1500 ppm, 3000 ppm, 4500 ppm, dan 6000 ppm. Setiap perlakuan terdiri dari 20 bibit, sehingga total populasi bibit adalah 100 bibit. Pelaksanaan percobaan terdiri dari persiapan penelitian, pembuatan larutan stok, perlakuan kolkisin, pemeliharaan, pengamatan morfologi, pengamatan stomata, dan pengamatan kromosom. Pengamatan pada penelitian ini dilakukan setelah 12 MSP dan parameter yang diamati meliputi umur muncul akar baru (HSP), jumlah akar (helai), panjang akar (cm), umur muncul daun baru (HSP), jumlah daun (helai), panjang daun (cm), lebar daun (cm), tebal daun (cm), warna daun, panjang tanaman (cm), jumlah stomata, kerapatan stomata (mm^{-2}), panjang stomata (μm), lebar stomata (μm), dan jumlah kromosom. Data pada pengamatan morfologi, stomata, dan kromosom dianalisis menggunakan T-Test (two tails) pada taraf 5%. Dimana data masing-masing konsentrasi pada semua parameter dibandingkan dengan data perlakuan 0 ppm atau kontrol.

Berdasarkan hasil pengamatan pemberian kolkisin berbeda nyata terhadap kontrol pada parameter umur muncul akar baru, dan jumlah akar pada konsentrasi 4500 ppm serta panjang akar pada konsentrasi 6000 ppm. Selain itu, T-Test menunjukkan hasil yang berbeda nyata terhadap kontrol pada parameter jumlah daun, lebar daun, dan tebal daun di konsentrasi 1500 ppm dan 4500 ppm. Pada pengamatan stomata menunjukkan hasil yang berbeda nyata terhadap kontrol pada parameter jumlah stomata dan kerapatan stomata di semua konsentrasi kolkisin, tetapi tidak berbeda nyata pada panjang dan lebar stomata. Pada parameter jumlah kromosom menunjukkan hasil yang berbeda nyata terhadap kontrol pada konsentrasi 3000 ppm, 4500 ppm, dan 6000 ppm. Pada pengamatan kromosom di konsentrasi 4500 ppm terdapat tanaman dengan jumlah 76 kromosom (Tetraploid). Namun, berdasarkan pengamatan stomata, rerata panjang stomata pada konsentrasi 4500 ppm masih tergolong diploid karena $\leq 1,25x$ panjang stomata kontrol (63,91 μm) yaitu 79,89 μm dan hasil T-test panjang stomata tidak berbeda nyata dengan kontrol. Sehingga, diduga tanaman tersebut termasuk mixoploid, dimana dalam satu jaringan atau tanaman memiliki dua tingkat ploidi yang berbeda, yaitu diploid dan tetraploid. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa perlakuan yang optimal untuk menghasilkan tanaman poliploid adalah 4500 ppm.



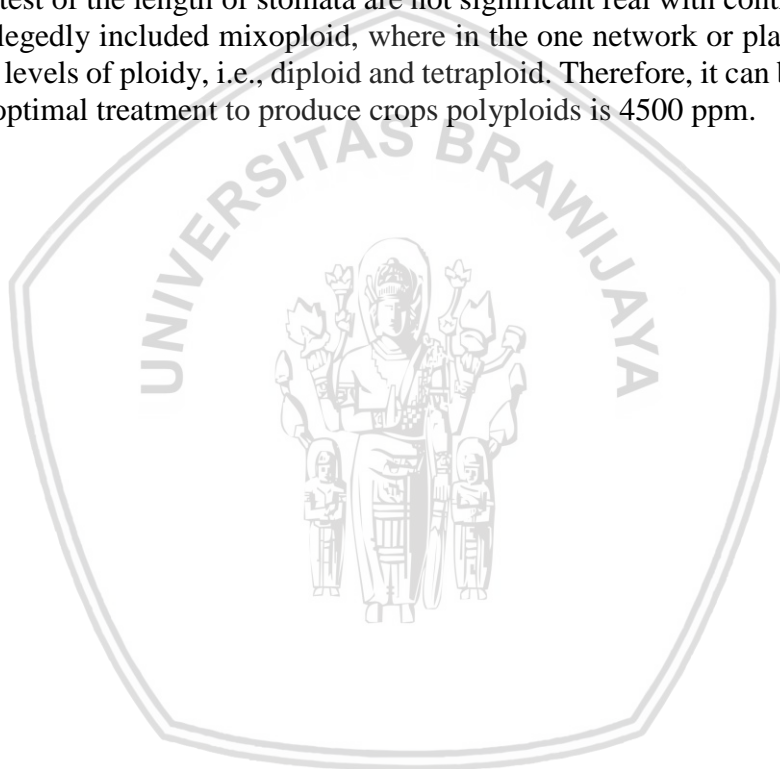
SUMMARY

MEI MASRUROH. 145040201111038. *In Vivo* Poliploidization of *Vanda Lombokensis* J. J. Sm. Orchid using Colchicine. Supervised by Prof. Dr.Ir. Lita Soetopo.

Orchid is one of the popular types of ornamental plants and a lot of interest because it has the shape and florals. It is estimated there are more than 5000 species scattered in forests throughout Indonesia from Sumatra to Papua. One type of orchid native to Indonesia which has an interesting flower is the orchid *Vanda lumbokensis* J. J. Sm. *Vanda lumbokensis* J. J. Sm. orchid Sm has the potential to be developed, considering it is still not a lot of research about *Vanda* orchids especially in Indonesian. One effort that can be done to develop the potential of the orchid *Vanda* is by using the mutagen to get other variations such as *Vanda* polyploids. One of these mutations are usually used in plant breeding activity is kolkisin. Colchicine (C₂₂H₂₅O₆N) is an alkaloid that can inhibit the formation of yarn spindle so that individual plants or polyploids formed. Polyploidy can result in flower size is bigger, more rounded flower forms, flower colors and a more concentrated (Miguel and Leonhardt, 2011). This research aims to get an effective concentration to produce orchids *Vanda lumbokensis* J. J. Sm. polyploids *in vivo*. The hypothesis of the research is there is an effective concentration of colchicine to produce the orchid *Vanda lumbokensis* J. J. Sm. polyploids *in vivo*.

Research has been conducted in January-July 2018 in CV Soerjanto Orchid Batu, Biotechnology laboratory, and Plant Breeding Laboratory, Agriculture Faculty, University of Brawijaya. The materials used include *Vanda lumbokensis* J. J. Sm. Orchid seedling aged 3 months after acclimatization, bamboo, kolkisin, ethanol, acetic acid, aquades, aceto orcein, HCL 1 N, spirtus, hidroksiquinolin, wipes, clear nail polish, gloves, injection spuit 1 mL, masks, paper label. Tools used in this research is the Pantone Color Chart, tray, ruler, bamboo, bottle spluit injection, 1 mL, plastic, rope, stationery, camera, eyedropper, tweezers, peparat glass, coverglass, bunsen, tube, caliper, glass watches, waterbath, razor blade, and the Olympus microscope. This research using concentration of colchicine treatment tested as many as five taraf, namely 0 (control), ppm 1500 ppm, 3000 ppm, ppm, 4500 and 6000 ppm. Each treatment consists of 20 seedlings, so that the total population of seedling is 100. The implementation of the experiment consist some activities are preparation of aqueous stock, colchicine treatment, maintenance, morphological observation, stomatal observation, chromosomes observation. Observation on the research done after 12 WAT and the observed parameters include age of the new roots emerge (dat), number of roots (strands), root length (cm), age of the new leaves emerge (dat), number of leaves (strands), leaf length (cm), leaf width (cm), leaf thickness (cm), color of leaves, plant length (cm), number of stomata, density of stomata (mm⁻²), length of stomata (μm), width of stomata (μm), and number of chromosomes. ata on observations of the morphology, stomata, and the chromosomes were analyzed using T-Test (two tails) at the 5% level. Where the respective data concentration on all parameters are compared to the data treatment 0 ppm or control.

Based on the observations, application of colchicine against real controls on **age of the new roots emerge** parameter, and the number of roots on a 4500 ppm, then roots length against real on a 6000 ppm. In addition, unlike real against controls number of leaves, leaf width, and leaf thickness in the 1500 ppm and 4500 ppm. Observation on stomata showed a different result against real controls on the parameters the number of stomata and the density of stomata in all concentrations of colchicine, but do not differ markedly on the length and width of the stomata. On a number of parameters of chromosomes showed a different result against real controls on concentration of 3000 ppm, ppm, 4500 and 6000 ppm. On observation of chromosome in plant there are 4500 ppm concentration with a population of 76 chromosomes (Tetraploid). However, based on observation of the stomata, the average length of stomata on 4500 ppm concentration is still classified as diploid because $<1,25 \times$ long stomata control ($63.91 \mu\text{m}$) namely $79.89 \mu\text{m}$ and the results of the T-test of the length of stomata are not significant real with control. So, these plants allegedly included mixoploid, where in the one network or plants have two different levels of ploidy, i.e., diploid and tetraploid. Therefore, it can be concluded that the optimal treatment to produce crops polyploids is 4500 ppm.



KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan nikmat dan karunia-Nya sehingga penyusunan skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik. Skripsi yang berjudul Poliploidisasi Anggrek *Vanda lombokensis* J. J. Sm. Menggunakan Kolkisin secara *In Vivo* disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Pertanian Strata Satu (S-1) sesuai dengan kurikulum Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penulisan skripsi ini, antara lain:

1. Keluarga Penulis (Bapak Buari, Ibu Suminah dan Kakak) yang senantiasa mendukung dan memberikan yang terbaik untuk penulis.
2. Prof. Dr.Ir. Lita Soetopo selaku dosen pembimbing yang dengan sabar memberikan bimbingan dalam penelitian dan penulisan skripsi ini
3. Ir. Arifin Noor Sugiharto, M.Sc.,Ph.D. yang telah memberikan masukan koreksi dalam penelitian dan penulisan skripsi ini.
4. Bapak R. Soerjanto Notodirdjo dan Soerjanto Orchid yang telah menyediakan fasilitas selama penelitian.
5. Rekan penelitian (Oktarina Hardianti, Bagus Keswara, Diana Rizky) yang telah menemani dan membantu penulis selama penelitian.
6. Semua sahabat (Ahjumma, Saetik, Riska, Supri, Ima, Meilia, dll) yang selalu memberikan semangat dan dukungan dalam penelitian dan penulisan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa masih terdapat kekurangan dalam skripsi ini sehingga kritik dan saran yang membangun diperlukan untuk kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini bermanfaat untuk semua pihak yang membutuhkan.

Malang, Agustus 2018

Penulis

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Sidoarjo pada tanggal 05 Mei 1996 sebagai putri Bapak Buari dan Ibu Suminah dan anak terakhir dari empat bersaudara. Penulis menempuh pendidikan dasar di SDN Kebaron pada tahun 2002 hingga tahun 2007, kemudian menulis melanjutkan ke SMPN 1 Krembung pada tahun 2007 dan lulus pada tahun 2011. Pada tahun 2011 hingga tahun 2014 penulis melanjutkan studi ke SMAN 4 Sidoarjo. Pada tahun 2014 penulis terdaftar sebagai mahasiswa Strata-1 Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang, Jawa Timur melalui Jalur SNMPTN sebagai mahasiswa penerima beasiswa BIDIK MISI.

Selama menjadi mahasiswa penulis aktif mengikuti organisasi dan kepanitiaan. Pada tahun 2015 penulis diamanahkan sebagai Staff Ahli Bendahara Kabinet BEM FP UB 2015 yang kemudian diamanahkan sebagai Wakil Bagian Keuangan dan Kemitraan BEM FP UB pada tahun 2016 sekaligus sebagai Staff Ahli Presidium Nasional 3 Ikatan BEM seluruh Indonesia (IBEMPI). Pada tahun 2017 penulis aktif dalam himpunan jurusan sebagai Bendahara Umum Himpunan Mahasiswa Budidaya Pertanian (HIMADATA) Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya. Penulis juga pernah menjadi panitia di beberapa kegiatan besar di Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya, salah satunya yakni Seminar Nasional Cita Bangsa tahun 2015 sebagai bendahara pelaksana, *Indonesian Student Summit* 2015 sebagai bendahara pelaksana, Bina Desa Nasional IBEMPI 2016 sebagai bendahara pelaksana, *Indonesian Student Summit* 2016 sebagai Stering Komite, Program Orientasi Terpadu (POSTER) FP UB 2016 sebagai koordinator divisi konsumsi, dan kegiatan pengabdian masyarakat KAMPUS TANI Himpunan Mahasiswa Budidaya Pertanian 2017 di desa Ngadirejo Kecamatan Jabung sebagai Stering Komite. Selain aktif dalam kegiatan organisasi dan kepanitiaan, penulis juga pernah menjadi asisten praktikum Pemuliaan Tanaman pada tahun 2016 dan asisten Teknologi Produksi Benih pada tahun 2017. Selain itu, penulis juga pernah lolos Pendanaan Program Kreativitas Mahasiswa (PKM) bidang Kewirausahaan pada tahun 2016 dan Program Mahasiswa Wirausaha pada tahun 2017.

DAFTAR ISI

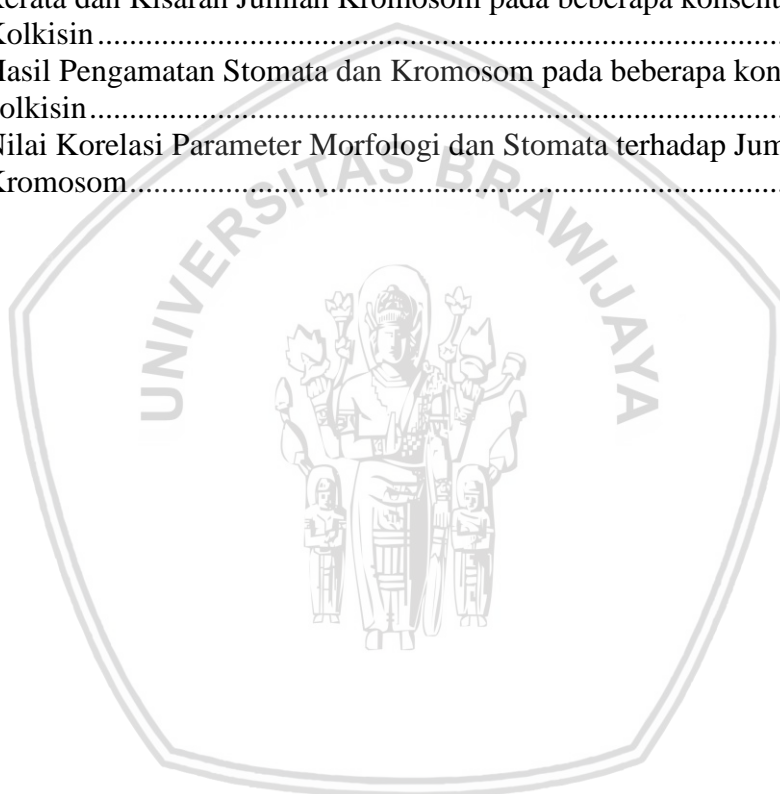
	Halaman
RINGKASAN	i
SUMMARY	iii
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR RIWAYAT HIDUP.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan	3
1.3 Hipotesis	3
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Deskripsi Tanaman	4
2.2 Botani Anggrek Vanda	4
2.3 Morfologi Anggrek Vanda.....	5
2.4 Poliploidi.....	8
2.5 Poliploidisasi dengan Kolkisin	10
2.6 Faktor yang Mempengaruhi Penggandaan Kromosom.....	11
3. BAHAN DAN METODE	14
3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan	14
3.2 Alat dan Bahan.....	14
3.3 Metode Penelitian	14
3.4 Pelaksanaan Percobaan	14
3.5 Pengamatan Percobaan	18
3.6 Analisa Data.....	21
4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	22
4.1 Hasil	22
4.2 Pembahasan.....	37
5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	49
5.1 Kesimpulan	49
5.2 Saran	49

DAFTAR PUSTAKA	50
LAMPIRAN	54



DAFTAR TABEL

Nomor	Teks	Halaman
1.	Nilai T-Test dan Rerata Parameter Morfologi pada Beberapa Konsentrasi Kolkisin terhadap Kontrol	22
2.	Warna Daun Baru pada Berbagai Konsentrasi Kolkisin.....	24
3.	Nilai T-Test dan Rerata Parameter Stomata pada Beberapa Konsentrasi Kolkisin terhadap Kontrol	24
4.	Nilai T-Test dan Rerata Jumlah Kromosom pada Beberapa Konsentrasi Kolkisin terhadap Kontrol	25
5.	Rerata dan Kisaran Jumlah Kromosom pada beberapa konsentrasi Kolkisin	26
6.	Hasil Pengamatan Stomata dan Kromosom pada beberapa konsentrasi kolkisin.....	27
7.	Nilai Korelasi Parameter Morfologi dan Stomata terhadap Jumlah Kromosom.....	36



DAFTAR GAMBAR

Nomor	Teks	Halaman
1.	Tanaman <i>Vanda lumbokensis</i> J. J. Sm	6
2.	<i>Vanda coerulea</i> , <i>Vanda</i> berdaun lebar seperti pita (<i>Vanda teret</i>)	7
3.	Bunga <i>Vanda lumbokensis</i> J. J. Sm	8
4.	Ukuran stomata bibit <i>Phalaenopsis amabilis</i> setelah 24 minggu perlakuan penetesan kolkisin.....	9
5.	Bunga <i>Phalaenopsis schilleriana</i> diploid (kanan), tetraploid (kiri) ..	9
6.	Bentuk ujung akar.....	40



DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Teks	Halaman
1.	Denah Percobaan.....	54
2.	Denah Tray.....	55
3.	Perhitungan Kebutuhan Kolkisin	56
4.	Deskripsi tanaman <i>Vanda lombokensis</i> J. J. Sm	58
5.	Tabel T-Test pada Beberapa Konsentrasi Kolkisin	59



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Anggrek merupakan salah satu jenis tanaman dari famili Orchidaceae yang populer dan banyak diminati baik di dalam maupun di luar negeri. Anggrek merupakan tanaman dari keluarga monokotil terbesar dengan estimasi populasi mencapai 25.000 spesies di dunia (Hsiao *et al.*, 2008). Indonesia merupakan negara dengan jenis anggrek yang melimpah. Terdapat kurang lebih 5000 spesies tersebar di hutan-hutan seluruh Indonesia dari Sumatera hingga Papua (Suryani, 2015). Hal ini menjadi potensi untuk mengembangkan dan menghasilkan anggrek-anggrek dengan kualitas yang tinggi, baik dari segi corak, warna, bentuk bunga, maupun keserempakan berbunga. Keindahan dan keunikan bunga anggrek menjadi daya tarik tersendiri, sehingga saat ini perkembangannya pun semakin pesat.

Tanaman anggrek selain sebagai tanaman hias juga banyak diproduksi sebagai bunga potong. Bahkan Indonesia menjadi pengeksport anggrek potong di beberapa negara di Asia. Berdasarkan Badan Pusat Statistik (2016) produksi anggrek sebagai bunga potong pada tahun 2016 mengalami penurunan dari 21.514.789 tangkai pada tahun 2015 menjadi 19.978.078 tangkai. Namun, ekspor anggrek pada tahun 2016 mengalami kenaikan sebesar 0,23%, dari 35,94 ton pada tahun 2015 menjadi 44,12 ton di tahun 2016. Daerah yang menyumbang produksi anggrek dalam negeri terbanyak adalah Banten (36,46%), Jawa Barat (25,08%), Jawa Timur (18,55%), dan beberapa daerah lainnya. Salah satu jenis anggrek yang banyak diminati dan berpotensi untuk dikembangkan adalah anggrek *Vanda*.

Vanda merupakan jenis anggrek epifit yang tumbuh menumpang pada tanaman lain tetapi tidak bersifat parasit. *Vanda* memiliki ragam warna, bentuk, dan warna bunga, hal ini menjadi ciri khas yang membedakan dengan anggrek lainnya. Salah satu spesies anggrek *Vanda* dengan bunga yang menarik adalah anggrek *Vanda lobbokensis* J. J. Sm. Anggrek dengan nama lengkap *Vanda lobbokensis* J.J.Sm. merupakan salah satu anggrek asli Indonesia yang ditemukan oleh Johannes Jacobus Sm. di Kepulauan Sunda kecil, Nusa Tenggara Barat (Smith, J. J, 1925; Journal Storage (JSTOR). 2000; Roberts *et al.*, 2002). Anggrek *Vanda lobbokensis* J. J. Sm. memiliki kesamaan dengan *Vanda tricolor* dari segi corak

bunga, tetapi memiliki bentuk bunga dan ukuran yang berbeda. Anggrek *Vanda lumbokensis* J. J. Sm. memiliki beberapa varian warna seperti dasar bunga berwarna kuning dengan lip putih, warna dasar bunga putih dengan lip pink atau warna dasar bunga putih dan kuning dengan lip putih. Anggrek *Vanda lumbokensis* J. J. Sm. memiliki potensi untuk dikembangkan, mengingat masih belum banyak penelitian tentang anggrek *Vanda* terutama di Indonesia. Pengembangan anggrek Indonesia didominasi oleh anggrek *Phalaenopsis* dan *Dendrobium* baik tingkat spesies maupun hibrida. Adanya pengembangan pada anggrek *Vanda* tentunya dapat meningkatkan nilai komersilnya di pasaran, sehingga dapat bersaing dengan jenis anggrek lainnya.

Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk mengembangkan potensi anggrek *Vanda* adalah dengan menggunakan mutagen, sehingga didapatkan variasi lain dari anggrek *Vanda* seperti *Vanda* poliploid. Pada umumnya mutagen yang banyak digunakan adalah mutagen kimia yaitu, kolkisin. Kolkisin ($C_{22}H_{25}O_6N$) merupakan suatu alkaloid yang diperoleh dari umbi tanaman *Colchichum autumnale* L. (Familia Liliaceae) (Suminah, Sutarno, dan Setyawan, 2002). Kolkisin dapat menyebabkan penggandaan jumlah kromosom karena kolkisin menghalangi aktifnya mekanisme benang gelendong, sehingga tidak terjadi pembelahan sel (kromosom tidak tertarik ke masing-masing kutub pada saat anafase), sementara kromosom sudah melakukan replikasi sehingga jumlahnya mengganda (Jensen, 1974 dalam Syukur *et al.*, 2013). Secara morfologi, poliploid dapat menghasilkan ukuran bunga yang lebih besar, bentuk bunga yang lebih bulat, dan warna bunga yang lebih pekat (Miguel dan Leonhardt, 2011). Adanya induksi kolkisin maka dapat menghasilkan tanaman yang memiliki karakteristik yang berbeda dari tanaman diploidnya sehingga meningkatkan keragaman suatu spesies.

Pada penelitian Kerdsuwan dan Te-chato (2012) menunjukkan bahwa pemberian kolkisin pada PLBs anggrek Chang Daeng (*Rhynchostylis gigantean* var. *rubrum* Sagarik) pada konsentrasi 0.2% selama 72 jam memiliki presentase tertinggi terhadap terbentuknya anggrek Chang Daeng tetraploid yaitu sebesar 60% dari 5 planlet. Selain itu, planlet tetraploid juga memiliki kerapatan sel penjaga tertinggi yaitu 3.00 cell/mm². Sementara jumlah kloroplas dan panjang akar pada planlet tetraploid lebih rendah dibandingkan planlet diploid.

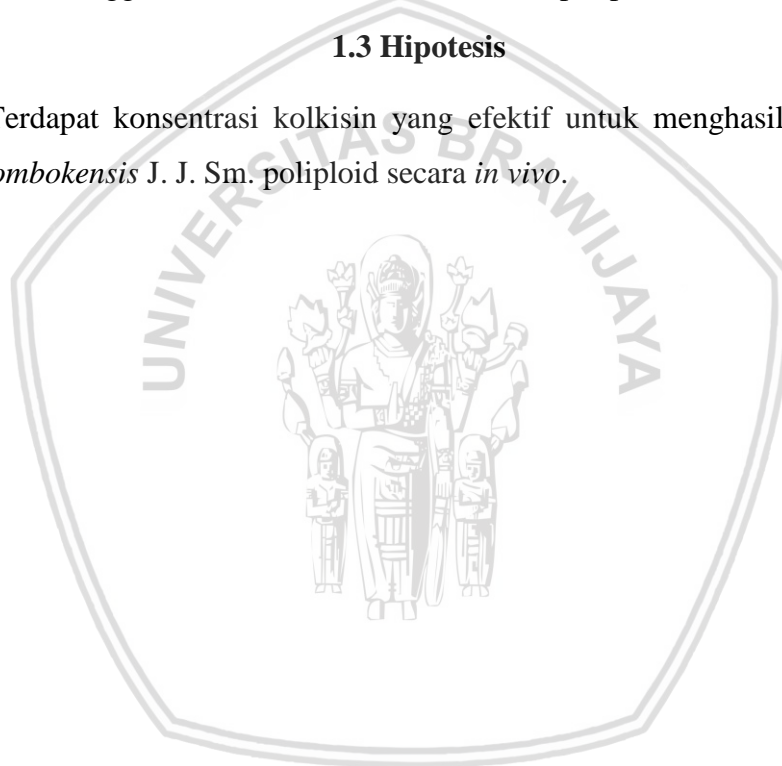
Berdasarkan penelitian yang sudah ada, poliploidi dapat menghasilkan tanaman yang lebih baik dibandingkan diploidnya baik dari segi morfologi, anatomi maupun sitologi. Namun, konsentrasi kolkisin yang efektif untuk induksi poliploidi anggrek *Vanda lombokensis* J. J. Sm. belum diketahui. Oleh karena itu, penelitian untuk mengetahui konsentrasi kolkisin yang efektif dalam induksi poliploidi anggrek *Vanda lombokensis* J. J. Sm. perlu dilakukan.

1.2 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi yang efektif untuk menghasilkan anggrek *Vanda lombokensis* J. J. Sm. poliploid secara *in vivo*.

1.3 Hipotesis

Terdapat konsentrasi kolkisin yang efektif untuk menghasilkan anggrek *Vanda lombokensis* J. J. Sm. poliploid secara *in vivo*.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Deskripsi Tanaman

Pemerintah Indonesia, melalui Departemen Pertanian menetapkan tanaman anggrek sebagai komoditas hortikultura unggulan yang memiliki prospek agribisnis untuk dikembangkan (Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, 2007). Anggrek merupakan tanaman dari keluarga monokotil terbesar dengan estimasi populasi mencapai 25.000 spesies di dunia (Hsiao *et al.*, 2008). Perbanyakan melalui kultur in-vitro adalah metode perbanyakan yang sangat bermanfaat bagi spesies langka untuk tujuan konservasi dan hal ini sangat berguna untuk tanaman anggrek karena biji anggrek tidak memiliki cadangan makanan, sehingga di alam memerlukan bersimbiosis dengan mikoriza tertentu untuk berkecambah dengan pertumbuhan yang sangat lambat (Dutta *et al.*, 2011).

Diperkirakan terdapat kurang lebih 5000 spesies tersebar di hutan-hutan seluruh Indonesia dari Sumatera hingga Papua (Suryani, 2015). Hal ini menjadi potensi yang besar untuk dikembangkan, mengingat anggrek spesies memiliki penciri sendiri yang membedakan dengan spesies yang lain dan secara genetik tergolong homozigot. Saat ini, Indonesia menjadi pengeksport anggrek potong di beberapa negara di Asia. Berdasarkan Badan Pusat Statistik (2016) produksi anggrek sebagai bunga potong pada tahun 2016 mengalami penurunan dari 21.514.789 tangkai pada tahun 2015 menjadi 19.978.078 tangkai. Namun, ekspor anggrek pada tahun 2016 mengalami kenaikan sebesar 0,23%, dari 35,94 ton pada tahun 2015 menjadi 44,12 ton di tahun 2016. Selain itu, terdapat penambahan negara pengimpor anggrek, yaitu Korea dengan ekspor sebanyak 13 ton. Sehingga berdasarkan hal tersebut, peluang pengembangan anggrek sebagai komoditi ekspor semakin besar. Salah satu jenis anggrek yang memiliki potensi untuk dikembangkan adalah anggrek *Vanda*.

2.2 Botani Anggrek *Vanda*

Secara taksonomi anggrek *Vanda lombokensis* J. J. Sm. memiliki klasifikasi yaitu, kingdom Plantae, filum Tracheophyta, kelas Liliopsida, ordo Asparagales, famili Orchidaceae, genus *Vanda* (*Vanda* Jones ex R. Br.), spesies *Vanda lombokensis* J. J. Sm. (Global Biodiversity Information Facility). *Vanda* R. Br.

terdiri dari 73 spesies yang tersebar luas terutama di seluruh Asia Tenggara dari India dan Nepal, melalui Cina Selatan ke Korea dan Jepang, dan ke arah Selatan Filipina dan Indonesia, Australia Utara dan Kepulauan Solomon (Govaerts, 2012). Beberapa jenis anggrek *Vanda* R. Br antara lain *Vanda jennae* O'Bryne & Verm.; *Vanda limbata* Blume; *Vanda A lumbokensis* J.J.Sm.; *Vanda luzonica* Loher ex Rolfe; *Vanda merrillii* Ames & Quisumb dari grup *Deltoglossa* yang tersebar di Indonesia dan Filipina, kemudian spesies *Vanda flabellata* (Rolfe ex Downie) Christenson; *Vanda lilacina* Teijsm. & Binn.; *Vanda vietnamica* (Haager) L.M. Gardiner dari grup *Flabellata* yang tersebar di kawasan Indochina, spesies *Vanda coerulea* Griff. ex. Lindl. dan *Vanda coerulescens* Griff. Dari grup *Longicalcarata* yang tersebar di kawasan Himalaya, India, Nepal, Bhutan, dan Indochina serta banyak spesies lainnya (Gardiner *et al.*, 2013). Selain itu, juga terdapat beberapa jenis anggrek yang hanya tersebar di negara-negara tertentu, seperti *Vanda lumbokensis* J. J. Sm. *Vanda lumbokensis* J.J.Sm. merupakan salah satu anggrek asli Indonesia yang ditemukan oleh Johannes Jacobus Sm. di Kepulauan Sunda Kecil, Nusa Tenggara Barat (Smith, J. J, 1925; Journal Storage (JSTOR), 2000; Roberts, *et al.*, 2002;).

2.3 Morfologi Anggrek *Vanda*

Pola pertumbuhan anggrek terbagi menjadi dua yaitu simpodial dan monopodial. Pola simpodial adalah anggrek yang tidak memiliki batang utama, tangkai bunga keluar dari ujung batang dan akan berbunga kembali pada pertumbuhan anakan atau tunas baru. Tipe monopodial adalah anggrek yang pertumbuhan batangnya tumbuh lurus ke atas pada satu batang tanpa batas. Anggrek yang termasuk jenis simpodial adalah *Dendrobium*, *Cattleya*, *Oncidium* dan *Cymbidium*, sedangkan anggrek monopodial adalah *Vanda*, *Arachnis*, *Renanthera*, *Phalaenopsis* dan *Aerides*. Pola pertumbuhan monopodial artinya mempunyai pertumbuhan lurus ke atas tanpa batas, letak daun berselang-seling, dan primordia bunga keluar dari ruas batang diantara dua ketiak daun (Widiastoety, 2007).

Vanda merupakan genus anggrek yang termasuk kelompok *Vandaceae*. Anggrek kelompok *Vandaceae* mempunyai keragaman yang sangat besar, baik habitat, ukuran, bentuk, maupun warna bunganya. Berdasarkan cara hidupnya

anggrek kelompok *Vandaceous* ada yang bersifat terrestrial dan epifit. Menurut pola pertumbuhannya kelompok *Vandaceous* termasuk monopodial, artinya memiliki pertumbuhan ke atas tidak terbatas serta tidak berumbi seperti pada Gambar 1. Tangkai bunga keluar dari sisi-sisi batang, yaitu ada ruas-ruas batang diantara dua ketiak daun. Tangkai bunga tersebut keluar secara bergantian pada sisi batang sepanjang hidupnya (Widyastoety dan Santi, 2012).



Gambar 1. Tanaman *Vanda* (Widyastoety dan Santi, 2012).

Salah satu bagian terpenting dari anggrek adalah bunga. Bunga selain sebagai organ reproduksi juga sebagai ciri khas sehingga anggrek dapat dikenali dan dibedakan dengan tanaman lain yang bukan anggrek. Bunga anggrek memiliki lima bagian utama, yaitu sepal (daun kelopak), petal (daun mahkota), stamen (benang sari), pistil (putik) dan ovarium (bakal buah). Sepal anggrek berjumlah tiga buah sepal bagian atas disebut sepal dorsal sedangkan dua lainnya disebut sepal lateral. Anggrek memiliki tiga buah petal, petal kesatu dan kedua letaknya berseling dengan sepal. Petal ketiga mengalami modifikasi menjadi labellum (bibir). Bunga anggrek *Vanda* pada umumnya berwarna cerah dan memiliki aroma wangi pada jenis tertentu. Bunga dari kelompok *Vanda* ini mempunyai ukuran yang bervariasi, sari *Saccolabium* yang ukuran bunganya sangat kecil hingga ukuran bunga *Vanda* yang normal sekitar 6-8 cm. Perbedaan dalam satu genus biasanya terletak pada bentuk dan warna bunga terutama struktur labellum yang ada. Bahkan untuk beberapa *Vanda* hasil persilangan bunga yang didapat berukuran lebih besar dengan variasi corak, warna, dan bentuk yang beragam. *Vanda coerulea* yang memiliki bunga berwarna biru dengan retikulasi biru gelap seperti pada Gambar 2 (Widyastoety dan Santi, 2012).



Gambar 2. *Vanda coerulea*, *Vanda* berdaun lebar seperti pita (*Vanda teret*) (Widyastoety dan Santi, 2012).

Berdasarkan bentuk daunnya anggrek *Vanda* dibagi menjadi tiga kelompok yaitu *Vanda teret*/pensit, bersifat terrestrial, dimana tanaman membutuhkan cahaya matahari langsung 100%, misalnya *Vanda teres* dan *Vanda hookeriana*. Kelompok kedua yaitu *Vanda strap-leaf*/berdaun lebar, bersifat epifit, artinya tanaman membutuhkan sedikit naungan, misalnya *Vanda coerulea*, *Vanda tricolor*, *Vanda sumatrana* dan *Vanda sanderiana*. Kelompok ketiga yaitu *Vanda semiteret*, *Vanda intermediate* ini merupakan hasil perpaduan antara *Vanda teret* dengan *Vanda strap-leaf*. Jenis ini membutuhkan cahaya matahari langsung, misalnya *Vanda amesiana* dan *Vanda kimbalina* (Widyastoety dan Santi, 2012).

Tipe tumbuh anggrek *Vanda lobbokensis* J. J. Sm. yakni monopodial dengan batang kaku dan tinggi berkisar antara 20 cm-2 m. Anggrek *Vanda lobbokensis* J. J. Sm. memiliki kesamaan dengan *Vanda tricolor* dari segi corak bunga, tetapi memiliki bentuk bunga yang berbeda. Anggrek *Vanda lobbokensis* memiliki beberapa varian warna seperti dasar bunga berwarna kuning dengan lip putih, warna dasar bunga putih dengan lip pink atau warna dasar bunga putih dan kuning dengan lip putih dengan ukuran bunga 4-5 cm, seperti pada gambar 3. Setiap grup *Vanda* R. Br memiliki karakter morfologi yang membedakan dengan grup lainnya, seperti grup *Longicalcarata* yang memiliki warna biru pada sepal dan labellum, serta grup *Deltoglossa* yang ruas yang berbentuk silinder dengan pangkal yang menebal (Gardiner *et al.*, 2013).



Gambar 3. Bunga *Vanda lumbokensis* J. J. Sm (Sumber: Abidin, 2017)

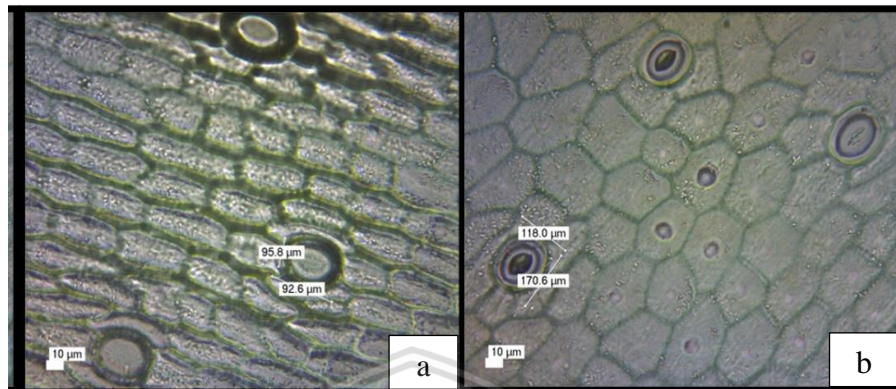
2.4 Poliploid

Poliploid merupakan keadaan dimana terdapat lebih dari dua set kromosom dalam sel tunggal atau organisme (Storme dan Mason, 2014). Poliploid dapat berasal dari penggandaan kromosom set dari spesies tunggal dan ini disebut autopoliploid, dan dapat juga berasal dari kombinasi set kromosom dari dua atau lebih spesies tanaman dan ini disebut allopoliploid. Perubahan jumlah kromosom dapat dibedakan atas euploid dan aneuploid. Pada kondisi euploid jumlah kromosom merupakan kelipatan dari kromosom dasarnya. Variasi euploid yang dapat terjadi adalah: monoploid (haploid; x), diploid ($2x$) dan poliploid yang terdiri dari: triploid ($3x$), tetraploid ($4x$), pentaploid ($5x$), heksaploid ($6x$), heptaploid ($7x$), oktaploid ($8x$) (Syukur *et al.*, 2012).

Tanaman poliploid biasanya memiliki karakteristik yang berbeda dengan tanaman diploidnya, baik dari segi morfologi (ukuran bunga), anatomi (jumlah stomata, ukuran stomata, kerapatan stomata, dll.) maupun sitologi (jumlah kromosom). Pada penelitian Omidbaigi *et al.* (2010a) yang menggunakan tanaman basil menunjukkan bahwa panjang stomata pada tanaman tetraloid 89% lebih besar dari diploidnya, dan diameter stomata tetraploid lebih tinggi dibandingkan diploidnya. Sementara itu, kerapatan stomata pada tanaman rumput pakan tetraploid lebih rendah dibandingkan tanaman diploid, dengan jumlah stomata diploid 63% lebih banyak dibandingkan tetraploid.

Sementara itu, pada penelitian Tuwo dan Indrianto (2016) menunjukkan bahwa ukuran stomata pada protocorm anggrek *Vanda* yang diberi kolkisin (poliploid) memiliki ukuran yang lebih besar dibanding dibandingkan yang kontrol (diploid). Panjang dan lebar stomata protocorm kontrol adalah 92,6 μm dan 95,8

μm . Sedangkan, panjang dan lebar stomata protocorm yang direndam kolkisin 1% selama 24 jam memiliki panjang dan lebar sebesar $170,6 \mu\text{m}$ dan $119,0 \mu\text{m}$ seperti pada Gambar 4.



Gambar 4. Ukuran stomata Vanda Hibrid; (a) Kontrol dan (b) Perlakuan kolkisin 1% dengan lama perendaman 24 jam (Tuwo dan Indrianto, 2016)

Stomata yang memiliki ukuran besar akan membuat jumlah stomata daun dalam satu kesatuan luas jaringan epidermis daun menjadi berkurang. Selain perbedaan dari segi anatomi, tanaman diploid dan poliploid juga memiliki perbedaan dari segi morfologi seperti ukuran bunga. Pada penelitian Chen, Tang dan Kao (2009) menunjukkan bahwa induksi kolkisin pada PLBs *Phalaenopsis schilleriana* tetraploid memiliki ukuran bunga yang lebih besar dibandingkan bunga diploidnya, seperti pada Gambar 5.



Gambar 5. Bunga *Phalaenopsis schilleriana* diploid (kanan), tetraploid (kiri) (Chen, *et al.*, 2009)

Sementara itu, pada penelitian Tuwo dan Indrianto (2016) menunjukkan bahwa jumlah akar pada bibit anggrek *Vanda* hybrid tetraploid lebih sedikit dibandingkan diploidnya. Selain itu, panjang akar bibit tetraploid juga lebih pendek dibandingkan akar bibit diploid.

2.5 Poliploidisasi dengan Kolkisin

Peningkatan keragaman suatu spesies dapat dilakukan melalui mutasi dengan induksi mutagen, baik mutagen kimia maupun fisik. Induksi mutagen dapat menyebabkan perubahan materi genetik pada makhluk hidup yang awalnya stabil (tidak berubah-ubah) atau normal menjadi tidak normal. Salah satu mutagen yang biasa digunakan dalam peningkatan keragaman genetik suatu spesies adalah kolkisin. Kolkisin ($C_{22}H_{25}O_6N$) merupakan suatu alkaloid berwarna putih yang diperoleh dari umbi tanaman *Colchichum autumnale* L. (Familia *Liliaceae*) (Suminah *et al.*, 2002). Kolkisin merupakan salah satu reagen untuk mutasi yang menyebabkan terjadinya poliploid. Senyawa ini dapat menghalangi terbentuknya benang- benang spindel pada pembelahan sel, sehingga jumlah kromosom dalam setiap sel menjadi dua kali lipat atau terjadi proses poliploidisasi (Suharni, 2004).

Setiap tanaman memiliki respon yang berbeda-beda terhadap pemberian kolkisin. Kolkisin yang diberikan pada tanaman tidak mempengaruhi semua sel tanaman, tetapi hanya sebagian sel saja dan masuknya zat kimia kolkisin ke dalam sel tanaman tidak dalam waktu yang bersamaan. Adanya pengaruh yang berbeda pada sel tanaman disebabkan kolkisin hanya efektif pada sel tanaman yang sedang aktif membelah. Kolkisin juga digunakan pada banyak spesies seperti basil (*Ocimum basilicum* L.) (Omidbaigi *et al.*, 2010a), *Dendrobium scabrilingue* L. (Saranthum *et al.*, 2010), *Vanda* Hybrid (*Vanda limbata* Blume x *Vanda tricolor* Lindl. Var. *suavis*) (Tuwo dan Indrianto, 2011), *Curcuma* Hybrid (*Curcuma sparganifolia* x *Curcuma parviflora*) (Ketmaro *et al.*, 2012), Hebe (*Oratia beauty*) (Gallone, Hunter, dan Douglas, 2014), *Thymus persicus* (Tavan, Mirjalili, dan Karimzadeh, 2015), *Dendrobium Sonia* (Lim *et al.*, 2017), *Trachyspermum ammi* L. (Noori *et al.*, 2017).

Aplikasi kolkisin secara *in vivo* dapat dilakukan dengan cara merendam bibit (Sulistianingsih, Suyanto, dan Noer, 2004), biji (Liu, Li, dan Bao, 2007; Omidbaigi, *et al.*, 2010a), maupun dengan penetesan kolkisin pada pucuk kecambah atau bibit (Liu *et al.*, 2007, Jadrná, Plavcová, dan Kobza, 2010, Omidbaigi *et al.*, 2010a). Hasil penelitian Jadrná *et al.* (2010) menunjukkan bahwa aplikasi kolkisin pada konsentrasi 0,1%-2,5% selama 2-7 hari dapat menginduksi tanaman *Pelargonium × hortorum* L.H. Bailey menjadi poliploid. Sementara itu,

Omidbaigi *et al.* (2010a) melaporkan bahwa penetesan kolkisin 5000 mg/L pada pucuk kecambah dapat menghasilkan tanaman *Ocimum basilicum* L. tetraploid.

Pada penelitian Kerdsuwan dan Te-chato (2012) menunjukkan bahwa pemberian kolkisin pada PLBs anggrek Chang Daeng (*Rhynchostylis gigantea* var. *rubrum* Sagarik) pada konsentrasi 0.2% selama 72 jam memiliki presentase tertinggi terhadap terbentuknya anggrek Chang Daeng tetraploid yaitu sebesar 60% dari 5 planlet, seperti pada Tabel 1. Selain itu, planlet tetraploid juga memiliki kerapatan sel penjaga tertinggi yaitu 3.00 cell/mm². Sementara jumlah kloroplast dan panjang akar pada planlet tetraploid lebih rendah dibandingkan planlet diploid. Hal tersebut menunjukkan bahwa aplikasi konsentrasi kolkisin yang tepat akan menghasilkan tanaman poliploid dengan presentase yang besar pula.

Menurut Miguel dan Leonhardt (2011), perlakuan induksi poliploidi yang efektif adalah perlakuan yang dapat menghasilkan banyak poliploid, namun tidak mematikan tanaman. Pada penelitian Tuwo dan Indrianto (2016) induksi kolkisin pada Plb anggrek *Vanda* Hybrid (*Vanda limbata* Blume X *Vanda tricolor* (Lindl.) var. *suavis*) dengan konsentrasi 0,5 % dan lama perendaman 6 jam efektif dalam menghasilkan anggrek tetraploid dengan jumlah kromosom 76 dari kromosom tanaman kontrol ($2n=2x=38$).

2.6 Faktor yang Mempengaruhi Penggandaan Kromosom Akibat Pemberian Kolkisin

Terjadinya penggandaan kromosom untuk menghasilkan tanaman poliploid dengan kolkisin dipengaruhi beberapa hal, antara lain:

- a. Metode aplikasi: Metode aplikasi atau cara aplikasi kolkisin akan mempengaruhi besarnya konsentrasi dan lama aplikasi kolkisin. Pada umumnya, aplikasi kolkisin dapat dilakukan melalui perendaman, ditetes, ataupun diberikan pada media kultur jaringan. Aplikasi kolkisin dengan cara direndam dilakukan pada lama perendaman tertentu biasanya menggunakan konsentrasi yang lebih rendah dibandingkan dengan cara ditetes. Kemudian aplikasi kolkisin dengan cara ditetes biasanya menggunakan konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan cara direndam maupun diberikan pada media tumbuh (kultur jaringan), dan aplikasinya dapat dilakukan lebih dari satu kali. Selain mempengaruhi besar kecilnya konsentrasi yang digunakan, cara aplikasi

juga mempengaruhi besarnya interaksi yang terbentuk antara subjek dengan kolkisin. Pemberian kolkisin pada intensitas tertentu dan dalam waktu tertentu dapat memperbesar peluang terbentuknya tanaman poliploid. Hal ini berkaitan dengan lamanya interaksi antara kolkisin dengan sel tanaman. Mengingat kolkisin hanya bekerja pada sel yang sedang aktif membelah. Namun hal ini juga tergantung pada bahan yang digunakan. Dhooghe *et al.* (2011) menyatakan bahwa efisiensi penggandaan kromosom bergantung pada beberapa faktor, yaitu spesies, agen anti-mitosis, tipe bahan, dan metode aplikasi.

b. Bahan yang digunakan

Bahan yang digunakan dalam aplikasi kolkisin akan mempengaruhi keefektifan kolkisin. Misalnya tanaman yang masih muda cenderung lebih responsif atau sensitif terhadap kolkisin dari pada tanaman yang tua, begitupun sebaliknya. Hal ini dikarenakan pembelahan sel pada tanaman muda cenderung lebih aktif dibandingkan pada tanaman yang lebih tua, sehingga sel-sel yang merespon pemberian kolkisin akan lebih banyak dibandingkan pada tanaman yang tua. Dhooghe *et al.* (2011) menyatakan bahwa eksplan yang berbeda membutuhkan metodologi yang berbeda, karena agen anti-mitosis hanya dapat memiliki dampak, ketika agen anti-mitosis dapat menembus sel

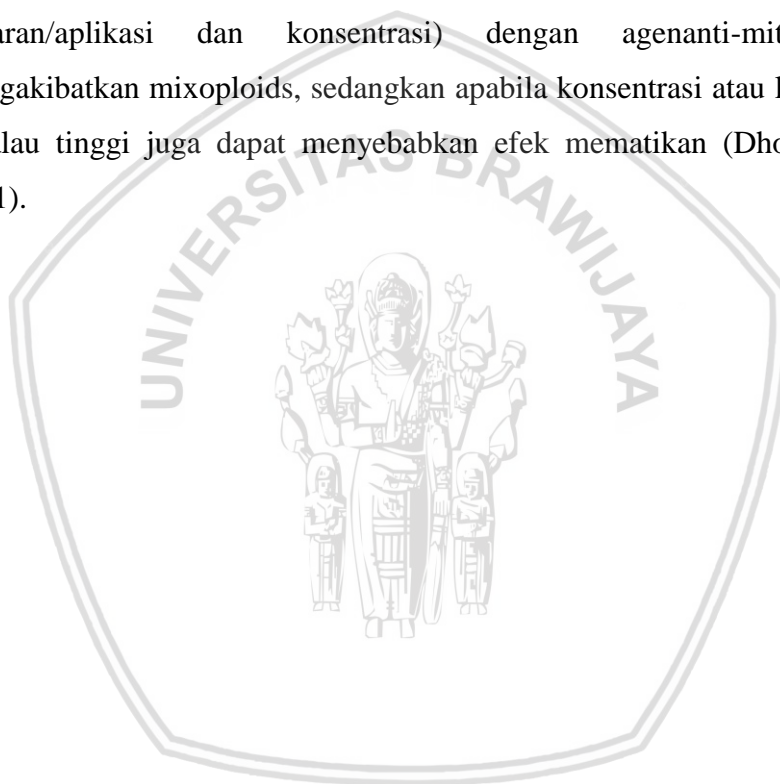
c. Konsentrasi

Besarnya konsentrasi yang digunakan dalam induksi kolkisin tergantung pada cara atau metode aplikasi dan bahan yang digunakan. Hal ini dikarenakan kolkisin dapat bersifat racun dan menyebabkan pertumbuhan abnormal bahkan kematian tanaman pada dosis tertentu. Konsentrasi yang tinggi dapat lebih efektif dibandingkan konsentrasi rendah, tetapi konsentrasi yang tinggi juga dapat menyebabkan adanya kimera, sedangkan konsentrasi yang rendah juga dapat menyebabkan tanaman tidak terpengaruh oleh perlakuan. Dhooghe *et al.*, (2011) menyatakan bahwa faktor yang mempengaruhi induksi poliploidi secara *in vivo* dan *in vitro* adalah konsentrasi agen anti-mitosis dan lama aplikasi.

d. Intensitas dan Lama aplikasi

Lama aplikasi kolkisin akan mempengaruhi keefektifan pengaruh kolkisin. Bahan yang berinteraksi dengan kolkisin dalam waktu yang cukup lama, maka

kemungkinan kolkisin untuk berinteraksi dengan sel yang aktif membelah akan semakin besar. Hal ini tentunya akan memperbesar peluang terbentuknya tanaman poliploid, sebagai akibat dari penggandaan kromosom karena penghambatan pembentukan benang spindle oleh kolkisin. Pada penelitian He *et al.* (2016) tentang induksi kolkisin pada *Dendranthema indicum* var. *aromaticum* yang menunjukkan bahwa induksi poliploid meningkat ketika konsentrasi dan durasi aplikasi kolkisin meningkat, tetapi pada konsentrasi tertentu peningkatan serta durasi aplikasi yang tinggi juga dapat menyebabkan penurunan tingkat kehidupan tanaman. Selain itu, kontak insufficient (lama paparan/aplikasi dan konsentrasi) dengan agenanti-mitosis dapat mengakibatkan mixoploids, sedangkan apabila konsentrasi atau lama aplikasi terlalu tinggi juga dapat menyebabkan efek mematikan (Dhooghe *et al.*, 2011).



3. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian telah dilaksanakan di CV Soerjanto Orchid Batu. Laboratorium Bioteknologi dan Laboratorium Pemuliaan Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya pada bulan Januari-Juni 2018.

3.2 Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bibit anggrek *Vanda lombokensis* J. J. Sm. yang berumur \pm 3 bulan setelah aklimatisasi, bambu, pupuk daun NPK (20:20:20), kolkisin, asam asetat, aceto orcein, hidroxyquinolin, HCL 1 N, aquades, spirtus, tisu, cat kuku bening, dan sarung tangan, masker, kertas label. Bibit berasal dari benih anggrek *Vanda lombokensis* J. J. Sm. yang kemudian disebar pada media VW. Bibit didapatkan dari Toko Anggrek Tengger Malang yang berumur 3 bulan setelah aklimatisasi. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Pantone Color Chart*, tray, penggaris, bambu, botol, injeksi spluit 1 mL, plastik, tali, alat tulis, kamera, pipet, pinset, kaca peparat, *coverglass*, bunsen, tube, jangka sorong, gelas arloji, *waterbath*, silet, dan mikroskop Olympus.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian dilakukan dengan perlakuan konsentrasi kolkisin dalam lima taraf yaitu 0 ppm (kontrol), 1500 ppm, 3000 ppm, 4500 ppm, dan 6000 ppm. Setiap perlakuan terdiri dari 20 bibit anggrek yang diikat di bambu yang telah dipasang di tray, sehingga total populasi bibit adalah 100 bibit. Denah percobaan terdapat pada Lampiran 1.

3.4 Pelaksanaan Percobaan

Pelaksanaan percobaan terdiri dari beberapa tahap, antara lain:

1. Persiapan Penelitian

Persiapan yang dilakukan meliputi penyediaan bahan alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian seperti pengadaan bibit anggrek, media tanam, serta bahan dan alat lainnya. Bahan yang digunakan adalah bibit yang berumur 3 bulan setelah aklimatisasi. Bibit tidak ditanam pada media tanam, melainkan diikat pada bambu yang telah dipasang pada tray. Daun dan akar

bibit yang telah tumbuh diberi tanda menggunakan spidol permanen untuk membedakan dengan akar dan daun yang tumbuh setelah perlakuan.

2. Pembuatan larutan stok

Larutan stok yang digunakan berasal dari campuran kolkisin dengan etanol. Kebutuhan larutan stok tiap perlakuan dihitung berdasarkan banyaknya sampel tiap perlakuan dengan banyaknya larutan stok yang diaplikasikan tiap tanaman. Aplikasi kolkisin setiap tanaman sebanyak 0,05 mL dengan jumlah tanaman tiap perlakuan yaitu 20 tanaman, sehingga banyaknya larutan stok yang dibutuhkan untuk 3x aplikasi yaitu 3 mL/perlakuan. Kemudian dihitung kebutuhan kolkisin tiap perlakuannya.

$$1000 \text{ ppm} = 1 \text{ g/L}$$

$$1000 \text{ ppm} = 1 \text{ mg/mL}$$

$$1500 \text{ ppm} = 1,5 \text{ mg/mL}$$

Jika pada konsentrasi 1500 ppm yang dibutuhkan hanya 3 mL, maka banyaknya kolkisin yang dibutuhkan adalah

$$\frac{1,5 \text{ mg}}{1 \text{ mL}} = \frac{\text{mg}}{3 \text{ mL}}$$

$$\text{mg} = \frac{1,5 \text{ mg} \cdot 3 \text{ mL}}{1 \text{ mL}}$$

$$\text{Kolkisin} = 4,5 \text{ mg/perlakuan}$$

Setelah itu, kolkisin dilarutkan dengan sedikit etanol kemudian ditambahkan aquades hingga 3 mL. Perhitungan kebutuhan kolkisin setiap perlakuan terdapat pada Lampiran 2.

3. Perlakuan kolkisin

Larutan kolkisin diaplikasikan pada pagi hari sekitar pukul 07.00-08.00 selama tiga hari berturut-turut, dimana satu hari diaplikasikan sebanyak 0,05 mL kolkisin. Aplikasi dilakukan dengan cara meneteskan kolkisin pada pucuk *Vanda lumbokensis* J. J. Sm. sebanyak empat tetes atau setara dengan 0,05 mL (0,0125 mL/tetes) dengan menggunakan injeksi spuit 1 mL, kemudian bibit *Vanda lumbokensis* J. J. Sm. disungkup dengan menggunakan plastik transparan, dan dibuka setelah 8 jam.

4. Pemeliharaan

Pemeliharaan yang dilakukan meliputi penyiraman, pemupukan, dan pengendalian hama penyakit. Penyiraman dilakukan setiap hari pada pagi hari, pemupukan dilakukan setiap seminggu sekali dengan dosis 1 g/L, dan pengendalian terhadap hama tungau dilakukan jika muncul gejala serangan tungau menggunakan akarisida Mite. Pengendalian terhadap gulma tidak dilakukan karena penelitian ini tidak menggunakan media tanam.

5. Pengamatan Morfologi

Pengamatan morfologi dilakukan pada semua tanaman yang meliputi parameter umur muncul akar baru, jumlah akar, panjang akar, umur muncul daun baru, jumlah daun, panjang daun, lebar daun, tebal daun, warna daun, dan panjang tanaman.

6. Pengamatan Stomata

Analisis stomata merupakan suatu metode yang fungsional dan ekonomis dalam menentukan tingkat ploidi pada famili Orchidaceae (Miguel dan Leonhardt, 2011). Tahap pengamatan stomata dilakukan sebagai berikut, daun yang digunakan adalah daun baru yang muncul setelah perlakuan dan telah membuka sempurna. Permukaan bawah daun diolesi dengan cat kuku transparan dan dibiarkan hingga kering. Setelah itu, selotip ditempelkan pada bagian permukaan daun yang telah diolesi cat kuku, kemudian selotip ditarik dengan perlahan dan diletakkan di atas kaca objek dan preparat diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran objektif (40x). Pengamatan jumlah dan kerapatan stomata dilakukan pada tiga bidang pandang (berdasarkan bagian preparat yang berbeda, ujung-tengah-ujung), kemudian satu stomata dipilih secara acak untuk diukur panjang dan lebarnya pada setiap bidang pandang. Foto hasil pengamatan stomata di mikroskop kemudian dianalisis menggunakan aplikasi ImageJ untuk dihitung jumlah stomata, kerapatan stomata, panjang stomata, dan lebar stomata.

7. Pengamatan Kromosom

Penghitungan kromosom pada sel-sel mitosis akar dilakukan untuk mengkonfirmasi tingkat ploidi tanaman pada sel-sel baru yang terbentuk setelah perlakuan kolkisin (Miguel dan Leonhardt, 2011). Analisis kromosom dilakukan dengan menggunakan metode Syukur *et al.*, (2013) modifikasi. Ujung akar aktif bibit *Vanda lumbokensis* J. J. Sm. dipotong sepanjang 0,5-1 cm, dan dimasukkan ke dalam tube yang sudah berisi larutan hidroksiquinolin dan direndam selama 24 jam untuk difiksasi pada suhu 4°C. Setelah 24 jam, akar dimasukkan ke dalam aquades dan direndam selama 5 menit, kemudian akar dipindahkan ke larutan asam asetat dan direndam selama 15 menit.

Selanjutnya, akar dipindah ke dalam tube yang berisi campuran asam asetat dan HCL 1 N dengan perbandingan 3: 1 dan dimasukkan ke dalam *waterbath* selama 10 menit, sebelum pemakaian *waterbath* dipanaskan selama 2 jam terlebih dahulu hingga suhu 60°C. Angkat dan letakkan potongan akar pada gelas arloji, lalu tetesi potongan akar dengan aceto orcein sebanyak 3-5 tetes dan diamkan selama 20 menit. Pindahkan potongan akar ke preparat, lalu potong ujung akar setipis mungkin dan tetesi dengan oceto orcein sebanyak 1-2 tetes, kemudian tutup dengan *coverglass*. Setelah itu, preparat dilewatkan di atas api bunsen sebanyak 3 kali. Preparat tidak boleh mengenai api bunsen. Kemudian, preparat diketuk-ketuk dengan menggunakan ujung pensil lalu *disquashing* atau ditekan secara halus searah jarum jam dengan menggunakan ibu jari. Kemudian, setiap sisi *coverglass* diolesi dengan cat kuku dan preparat siap diamati dengan Mikroskop Olympus dengan perbesaran 40x. Foto hasil pengamatan kromosom di mikroskop kemudian dianalisis menggunakan aplikasi ImageJ untuk dihitung jumlah kromosomnya.

3.5 Pengamatan Percobaan

Pengamatan yang dilakukan meliputi pengamatan morfologi, stomata, dan kromosom. Pengamatan morfologi dan stomata dilakukan secara non destruktif, sedangkan pengamatan sitologi dilakukan secara destruktif. Berikut merupakan parameter yang diamati pada setiap pengamatan, antara lain:

a. Pengamatan morfologi dilakukan setelah 12 minggu setelah perlakuan (MSP) yang meliputi parameter:

1. Umur muncul akar baru (HSP)

Diamati saat akar baru tumbuh $\pm 0,1$ cm dengan menghitung hari munculnya akar baru setelah perlakuan.

2. Jumlah akar

Diamati dengan menghitung jumlah akar yang tumbuh setelah perlakuan dan dalam kondisi sehat (tidak patah atau layu).

3. Panjang akar

Diamati dengan mengukur panjang akar dari pangkal akar hingga ujung akar menggunakan penggaris. Pengukuran dilakukan dengan cara meregangkan atau meluruskan akar kemudian dilakukan pengukuran. Akar yang diukur merupakan akar baru terpanjang (akar yang tumbuh setelah perlakuan) serta dalam kondisi sehat.

4. Umur muncul daun baru (HSP)

Diamati saat daun baru tumbuh $\pm 0,2$ cm dengan menghitung hari munculnya akar baru setelah perlakuan.

5. Jumlah daun

Diamati dengan menghitung daun yang tumbuh setelah perlakuan dan telah terbuka sempurna serta dalam kondisi sehat (tidak terserang hama penyakit, tidak keriput, tidak layu, dan berwarna hijau).

6. Panjang daun

Daun yang diamati adalah daun yang tumbuh setelah perlakuan dan sudah membuka sempurna. Panjang daun diamati dengan mengukur panjang dari pangkal daun hingga ujung daun menggunakan penggaris.

7. Lebar daun

Daun yang diamati adalah daun yang tumbuh setelah perlakuan dan sudah membuka sempurna. Lebar daun diamati mengukur bagian terlebar daun dari sisi yang satu ke sisi yang lain menggunakan penggaris.

8. Tebal daun

Daun yang diamati adalah daun yang tumbuh setelah perlakuan dan sudah membuka sempurna. Tebal daun diamati dengan mengukur tebal daun pada bagian tengah daun menggunakan jangka sorong.

9. Warna daun

Daun yang diamati adalah yang tumbuh setelah perlakuan dan sudah membuka sempurna. Warna daun diamati dengan menggunakan Pantone Color Chart.

10. Panjang tanaman

Diamati dengan cara mengukur mulai dari pangkal tanaman hingga daun paling panjang yang ditarik ke atas, pengukuran dilakukan menggunakan penggaris.

b. Pengamatan stomata

Pengamatan stomata dilakukan untuk mengamati stomata yang dilakukan setelah 12 MSP pada 5 bibit setiap perlakuan. Kriteria bibit yang digunakan yaitu, memiliki daun dan akar yang tumbuh setelah perlakuan, dimana ujung akar yang muncul setelah perlakuan harus dalam kondisi masih muda. Pengamatan stomata dilakukan pada daun paling muda dengan kriteria daun dalam kondisi sehat (tidak terserang hama penyakit, tidak keriput, dan tidak layu), dan telah membuka sempurna. Pengamatan stomata meliputi parameter:

1. Rata-rata jumlah stomata

Diamati dengan menghitung banyaknya stomata yang ada pada setiap bidang pandang, kemudian dihitung rata-rata dari keseluruhan bidang pandang.

$$\text{Rata rata jumlah stomata (Sa)} = \frac{Sa_1 + Sa_2 + \dots + Sa_n}{n}$$

Dimana: Sa_1 : Jumlah stomata bidang pandang 1

Sa_2 : Jumlah stomata bidang pandang 2

Sa_n : Jumlah stomata bidang pandang ke n

n : Banyaknya bidang pandang

2. Kerapatan stomata

Diamati dengan menghitung rata-rata jumlah stomata dari keseluruhan bidang pandang kemudian dibagi luas bidang pandang (μm^2).

$$\text{Kerapatan stomata (K}_{a_n}) = \frac{\text{rerata Sa}}{\text{LBP}}$$

Dimana: rerata Sa : Rata-rata jumlah kromosom

LBP : Luas bidang pandang ($0,19625\mu\text{m}^2$)

3. Panjang stomata

Stomata yang akan diukur panjangnya dipilih secara acak sebanyak tiga stomata, kemudian dilakukan pengukuran panjang stomata dengan menggunakan aplikasi ImageJ. Pengukuran panjang dilakukan dengan cara menarik garis antar sisi stomata (panjang) yang kemudian muncul angka yang menunjukkan panjang stomata yang diamati.

4. Lebar stomata

Pengukuran lebar stomata sama seperti pengukuran panjang stomata. Pengukuran lebar dilakukan dengan cara menarik garis antar sisi stomata yang lain (lebar) yang kemudian muncul angka yang menunjukkan lebar stomata yang diamati.

c. Pengamatan Kromosom

Pengamatan kromosom dilakukan setelah 12 MSP pada 5 bibit setiap perlakuan dengan kriteria bibit yaitu, memiliki daun dan akar yang tumbuh setelah perlakuan, dan ujung akar yang muncul setelah perlakuan harus dalam kondisi masih muda. Pengamatan kromosom dilakukan pada ujung akar dengan kriteria ujung akar dalam kondisi sehat (tidak terserang hama penyakit, tidak keriput, tidak busuk atau kering), dan ujung akar muda (berwarna hijau). Pengamatan kromosom meliputi parameter jumlah kromosom. Dimana jumlah kromosom diamati dengan menghitung banyaknya kromosom yang ada pada sel bibit yang diamati menggunakan aplikasi ImageJ dengan Type gambar 8-bit.

3.6 Analisis Data

Data pada pengamatan morfologi, stomata, dan kromosom dianalisis menggunakan T-Test (two tails) pada taraf 5% dengan Microsoft Excel. Dimana data masing-masing konsentrasi pada semua parameter dibandingkan dengan data perlakuan 0 ppm atau kontrol. Sedangkan, data kualitatif pada pengamatan morfologi dianalisis secara deskriptif. Untuk mengetahui keeratan hubungan semua parameter terhadap jumlah kromosom, maka dilakukan analisis korelasi. T-test yang digunakan jika varians populasi tidak diketahui, ukuran sampel sama/berbeda, dan varians diasumsikan berbeda adalah sebagai berikut.

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{s_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}}$$

dimana

s = Standart Deviasi

$$s_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2} = \sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}$$

untuk menentukan degree of freedom menggunakan rumus sebagai berikut:

$$d.f. = \frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1}\right)^2}{(n_1 - 1)} + \frac{\left(\frac{S_2^2}{n_2}\right)^2}{(n_2 - 1)}}$$

persamaan ini juga dikenal dengan Persamaan welch satterthwaite

$$r(xy) = \frac{\text{Cov}(xy)}{\sqrt{V_x \cdot V_y}}$$

Keterangan:

r (xy) = Korelasi antara sifat x dan sifat y

Cov g (xy) = Kovarian antara sifat x dan sifat y

\bar{V}_y = Varian sifat y

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

4.1.1 Pengamatan Morfologi

Pada penelitian ini, salah satu pengamatan yang menjadi indikator adanya tanaman poliploid adalah pengamatan morfologi. Morfologi tanaman dapat digunakan untuk menganalisa tingkat ploidi suatu tanaman berdasarkan ukuran, bentuk, warna bagian-bagian tanaman yang dibandingkan dengan tanaman diploid. Pada penelitian ini pengamatan morfologi tanaman penting adanya untuk mengetahui pengaruh atau respon tanaman terhadap pemberian perlakuan yang ditampilkan secara fenotipe. Pengamatan morfologi yang dilakukan meliputi parameter umur muncul akar baru, jumlah akar baru, panjang akar baru, umur muncul daun baru, jumlah daun baru, panjang daun baru, lebar daun baru, tebal daun baru, dan warna daun baru, dan panjang tanaman. Hasil T-Test dan Rerata Parameter Morfologi pada beberapa konsentrasi kolkisin terhadap kontrol disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil T-Test dan Rerata Parameter Morfologi pada beberapa konsentrasi kolkisin terhadap kontrol

Parameter	Perlakuan (ppm)									
	0 ppm		1500		3000		4500		6000	
	Rerata	Rerata	t hitung	Rerata	t hitung	Rerata	t hitung	Rerata	t hitung	
Umur Muncul Akar Baru	20,75	20,2	0,11 tn	17,45	0,56 tn	8,3	2,78*	20,6	0,02 tn	
Jumlah Akar	1	0,95	0,29 tn	0,75	1,56 tn	0,5	3,25*	0,75	1,31 tn	
Panjang Akar	2,42	1,64	1,71 tn	1,47	1,94 tn	1,54	1,76 tn	1,105	2,95*	
Umur Muncul Daun Baru	19,3	29,9	-1,72 tn	21,35	-0,35 tn	28,6	-1,69 tn	25,35	0,93 tn	
Jumlah Daun	0,75	1,2	-2,65*	0,9	-0,86 tn	1	-1,75 tn	0,8	-0,33 tn	
Panjang Daun	1,16	1,595	-1,53 tn	1,065	0,31 tn	1,38	-0,77 tn	1,695	-1 tn	
Lebar Daun	0,41	0,61	-2,64*	0,448	-0,5 tn	0,61	-2,61*	0,495	0,95 tn	
Tebal Daun	0,09	0,127	-2,58*	0,098	-0,63 tn	0,123	-2,32*	0,092	-0,3 tn	
Panjang Tanaman	3,71	4,005	-0,73 tn	3,55	0,5 tn	4,315	-1,56 tn	3,905	-0,46 tn	

Keterangan: * = Nyata pada taraf 5%, tn = Tidak nyata pada taraf 5%,

Berdasarkan tabel di atas, hasil T-test menunjukkan bahwa parameter umur muncul akar baru dan jumlah akar berbeda nyata pada konsentrasi 4500 ppm dengan nilai t hitung 2,78 serta tidak berbeda nyata pada konsentrasi lainnya. Sedangkan, pada parameter panjang akar menunjukkan hasil yang berbeda nyata pada konsentrasi 6000 ppm yaitu 2,95. Sementara itu, pada parameter umur muncul daun baru tidak berbeda nyata pada semua konsentrasi. Pada parameter jumlah daun menunjukkan hasil yang berbeda nyata pada konsentrasi 1500 ppm serta tidak berbeda nyata pada konsentrasi lainnya. Hasil parameter panjang daun dan panjang tanaman tidak berbeda nyata pada semua perlakuan. Sementara itu, pada parameter lebar daun dan tebal daun menunjukkan hasil yang berbeda nyata pada konsentrasi 1500 ppm dan 4500 ppm serta tidak berbeda nyata pada konsentrasi lainnya.

Tabel di atas juga menunjukkan bahwa rata-rata umur muncul akar baru terlama yaitu pada kontrol (20,75 HSP), sedangkan umur muncul akar baru tercepat yaitu pada konsentrasi 4500 ppm (8,3 HSP). Pada parameter jumlah akar dan panjang akar, rata-rata tertinggi terdapat pada kontrol sebanyak 1 helai dan rata-rata terendah terdapat pada konsentrasi 4500 ppm sebanyak 0,5 helai dan konsentrasi 6000 ppm (1,105 cm). pada parameter umur muncul daun baru terlama terdapat pada konsentrasi 1500 ppm (29,9 HSP) dan umur muncul tercepat yaitu kontrol (19,3 HSP). Rata-rata jumlah daun tertinggi terdapat pada konsentrasi 1500 ppm dan terendah pada kontrol. Rata-rata panjang daun tertinggi terdapat pada konsentrasi 6000 ppm sebesar 1,695 cm dan rata-rata terendah pada 3000 ppm sebesar 1.065 cm. pada parameter lebar dan tebal daun, rata-rata tertinggi terdapat pada konsentrasi 1500 ppm diikuti 4500 ppm dan rata-rata terendah terdapat pada kontrol. Sementara itu, rata-rata panjang tanaman tertinggi yaitu pada konsentrasi 4500 ppm sebesar 4,315 cm dan rata-rata terendah terdapat pada konsentrasi 3000 ppm yaitu 3,55 cm. Hasil dari parameter Warna Daun yang disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Warna Daun pada beberapa konsentrasi kolkisin

Perlakuan	Warna Daun
0 ppm	Pantone 18-0130 TPX (Cactus)
1500 ppm	Pantone 18-0130 TPX (Cactus)
3000 ppm	Pantone 18-0130 TPX (Cactus)
4500 ppm	Pantone 18-0130 TPX (Cactus)
6000 ppm	Pantone 18-0130 TPX (Cactus)

Berdasarkan tabel di atas dapat diketahui bahwa warna daun pada semua perlakuan didominasi oleh warna Cactus dengan kode Pantone 18-0130 TPX.

4.1.2. Pengamatan Stomata

Pengamatan stomata pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian kolkisin terhadap stomata tanaman. Dimana pengamatan stomata dapat digunakan sebagai salah satu indikator ploidi suatu tanaman. Indikator ploidi pada pengamatan stomata dapat dilihat dari parameter jumlah stomata, kerapatan stomata, panjang stomata, dan lebar stomata. Berikut merupakan Nilai T-Test dan rerata parameter stomata pada beberapa konsentrasi kolkisin terhadap kontrol yang disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Nilai T-Test dan Rerata Parameter Stomata pada beberapa konsentrasi kolkisin terhadap kontrol

Parameter	Perlakuan (ppm)									
	0 ppm		1500		3000		4500		6000	
	Rerata	Rerata	t hitung	Rerata	t hitung	Rerata	t hitung	Rerata	t hitung	Rerata
Jumlah Stomata	5,93	3,73	6,08*	3,33	7*	3,4	4,93*	3,93	2,93*	
Kerapatan Stomata	30,23	19,02	6,08*	16,99	7*	17,32	4,93*	20,04	2,93*	
Panjang Stomata	63,94	67,34	-1,11 tn	67,83	-0,79 tn	68,79	-1,53 tn	65,54	-0,48 tn	
Lebar Stomata	54,99	58,46	-0,75 tn	60,39	-1,28 tn	60,16	-1,46 tn	60,31	-1,11 tn	

Keterangan: * = Nyata pada taraf 5%, tn = Tidak nyata pada taraf 5%,

Berdasarkan tabel di atas dapat diketahui bahwa jumlah dan kerapatan stomata berbeda nyata pada semua konsentrasi kolkisin. Dimana rata-rata jumlah dan kerapatan tertinggi terdapat pada kontrol dengan jumlah 5,93 serta kerapatan $30,23 \text{ mm}^{-2}$, sedangkan jumlah dan kerapatan terendah terdapat pada konsentrasi 3000 ppm dengan jumlah 3,33 serta kerapatan $16,99 \text{ mm}^{-2}$. Sementara itu, panjang stomata dan lebar stomata tidak berbeda nyata pada semua konsentrasi. Dimana Panjang stomata tertinggi terdapat pada konsentrasi 4500 ppm sebesar $68,79 \mu\text{m}$ dan panjang stomata terendah terdapat pada kontrol sebesar $63,94 \mu\text{m}$. Lebar stomata tertinggi terdapat pada konsentrasi 3000 ppm sebesar $60,39 \mu\text{m}$, dan lebar stomata terendah terdapat pada kontrol sebesar $54,99 \mu\text{m}$.

4.1.3 Pengamatan Kromosom

Selain pengamatan secara morfologi dan stomata, pengamatan ploidi suatu tanaman juga dapat dilakukan melalui pengamatan kromosom. Hal ini dikarenakan ploidi suatu tanaman berkaitan dengan jumlah kromosom yang ada pada sel tanaman. Oleh karena itu, pengamatan ploidi berguna untuk memberikan informasi mengenai jumlah kromosom pada setiap perlakuan. Nilai T-Test dan rerata jumlah kromosom pada beberapa konsentrasi kolkisin terhadap kontrol disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Nilai T-Test dan Rerata Jumlah Kromosom pada beberapa konsentrasi kolkisin terhadap kontrol

Parameter	Perlakuan (ppm)									
	0 ppm		1500		3000		4500		6000	
	Rerata	Rerata	t hitung		Rerata	t hitung	Rerata	t hitung	Rerata	t hitung
Jumlah Kromosom	38	40,2	-1,62 tn		45,4	-2,87*	58,6	-2,97*	43,4	-3,03*

Keterangan: * = Nyata pada taraf 5%, tn = Tidak nyata pada taraf 5%,

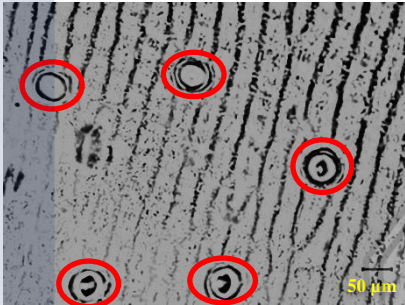


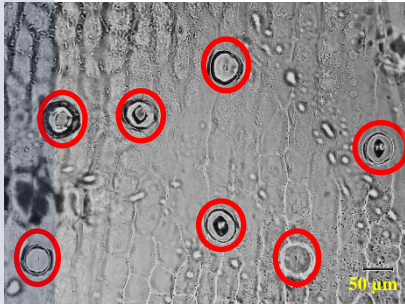


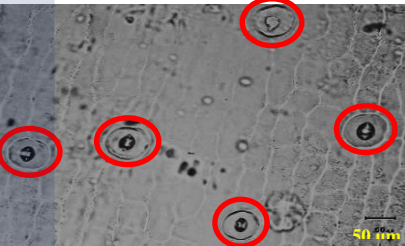


Berdasarkan tabel di atas, hasil T-Test menunjukkan bahwa parameter jumlah kromosom berbeda nyata pada konsentrasi 3000, 4500, dan 6000 ppm dengan rata-rata tertinggi pada konsentrasi 4500 ppm yaitu 58,6 kromosom. Sedangkan tidak berbeda nyata pada konsentrasi 1500 ppm. Rerata dan kisaran jumlah kromosom pada berbagai konsentrasi kolkisin disajikan pada Tabel 5.

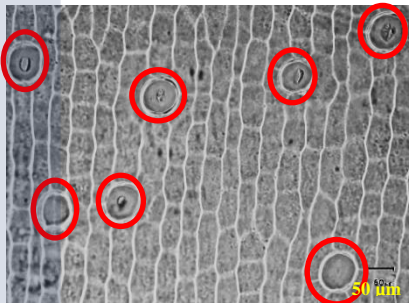
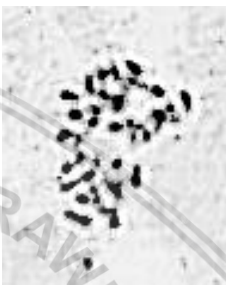

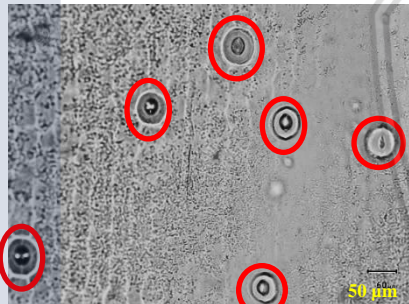


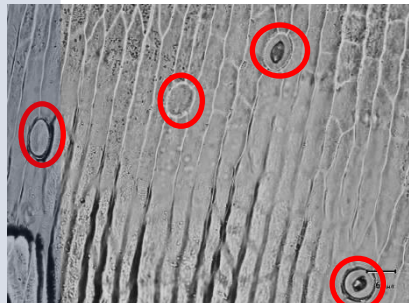


Tabel 5. Rerata dan Kisaran Jumlah Kromosom pada beberapa konsentrasi kolkisin

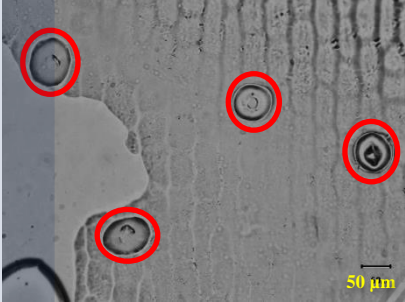
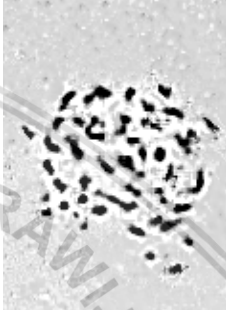

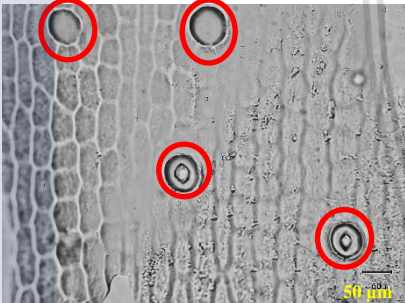


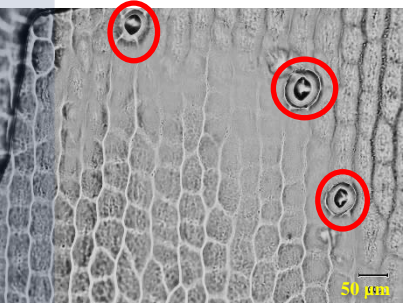
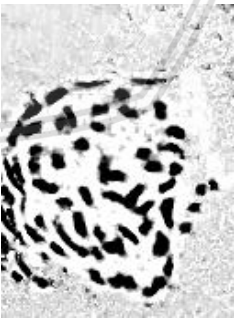

Perlakuan	Rata-Rata Jumlah Kromosom	Kisaran Jumlah Kromosom
0 ppm	38	38
1500 ppm	40	38-44
3000 ppm	45	38-52
4500 ppm	59	43-76
6000 ppm	42	38-50

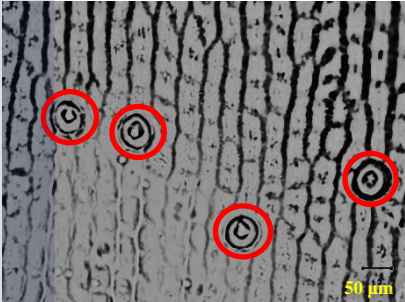



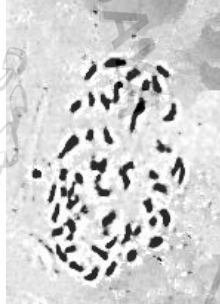

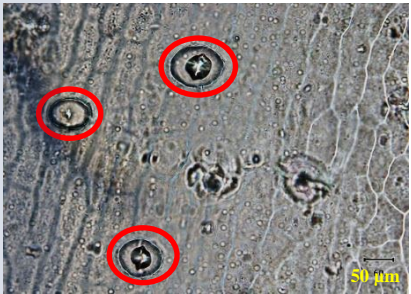


Berdasarkan tabel di atas dapat diketahui jumlah kromosom akibat pemberian kolkisin. Dimana perlakuan yang memiliki kisaran jumlah kromosom terbanyak yaitu 4500 ppm dengan kisaran 43-76 kromosom yang kemudian diikuti perlakuan 3000 ppm dan 6000 ppm, sedangkan perlakuan dengan kisaran jumlah kromosom terendah yaitu 0 ppm dengan jumlah 38 kromosom. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan yang optimal untuk menghasilkan poliploid yaitu perlakuan dengan konsentrasi 4500 ppm. Hasil pengamatan kromosom disajikan pada Tabel 6.




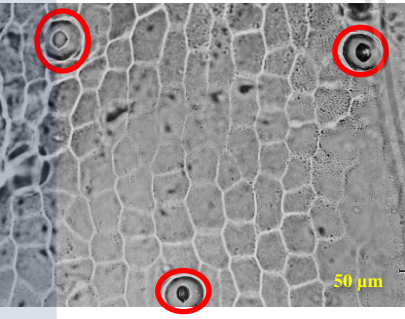
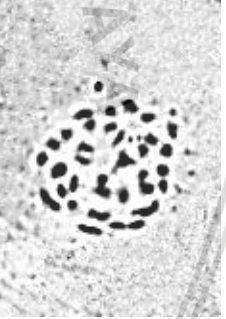

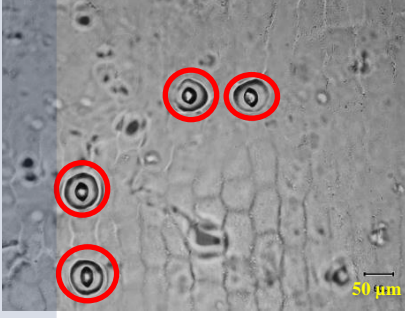
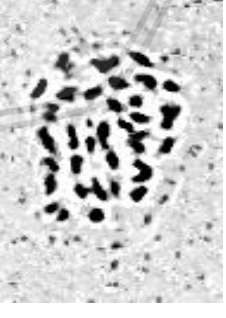

Tabel 6. Hasil Pengamatan Stomata dan Kromosom pada berbagai konsentrasi kolkisin

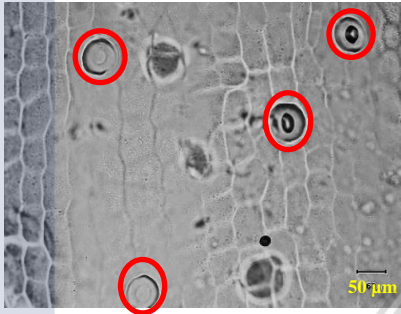
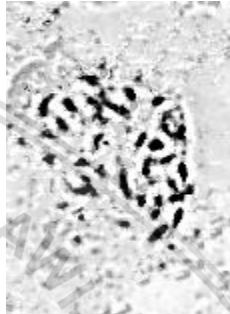

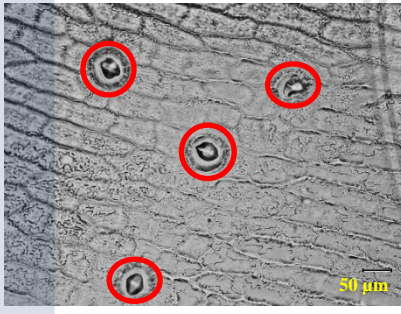
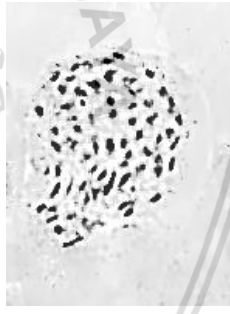




Perlakuan	Dok. Stomata	Data Stomata	Dok. Kromosom	Dok. Tanaman	Σ Kromosom
0 ppm		Jumlah stomata : 5,33 Kerapatan : 27,18 mm ⁻² Panjang stomata : 61,42 μm Lebar stomata : 50,45 μm			38
		Jumlah stomata : 6,67 Kerapatan : 33,97 mm ⁻² Panjang stomata : 57,13 μm Lebar stomata : 57,13 μm			38
		Jumlah stomata : 5,33 Kerapatan : 27,18 mm ⁻² Panjang stomata : 69,89 μm Lebar stomata : 63,78 μm			38

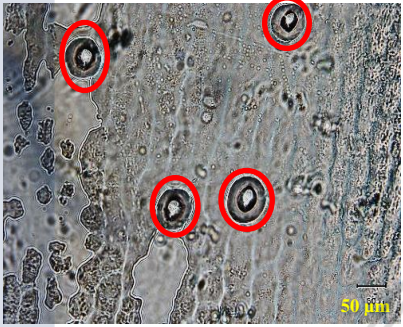
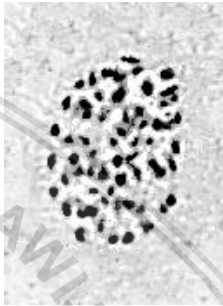

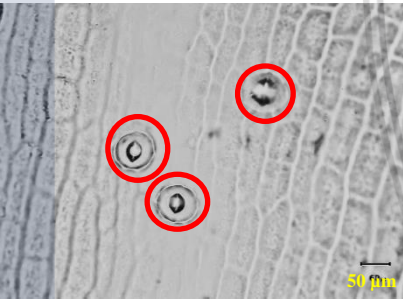

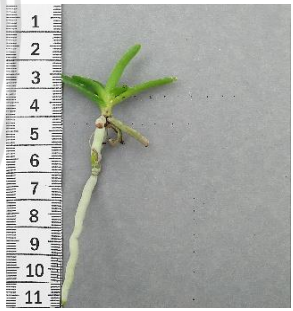

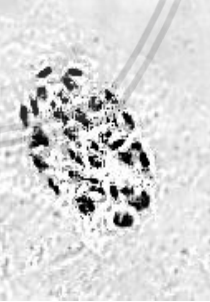

Perlakuan	Dok. Stomata	Data Stomata	Dok. Kromosom	Dok. Tanaman	Σ Kromosom
0 ppm		Jumlah stomata : 6,67 Kerapatan : 33,97 mm ⁻² Panjang stomata : 69,72 μm Lebar stomata : 58,46 μm			38
		Jumlah stomata : 5,67 Kerapatan : 28,87 mm ⁻² Panjang stomata : 69,73 μm Lebar stomata : 50,33 μm			
1500 ppm		Jumlah stomata : 4 Kerapatan : 20,38 mm ⁻² Panjang stomata : 69,73 μm Lebar stomata : 46,56 μm			38

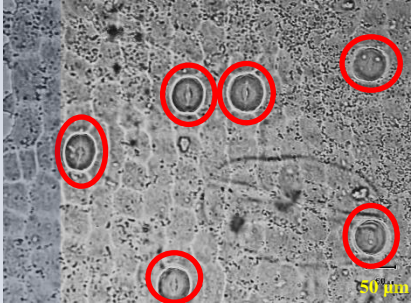
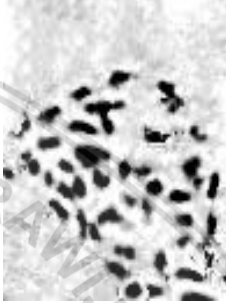

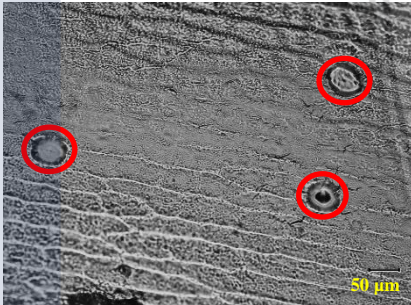
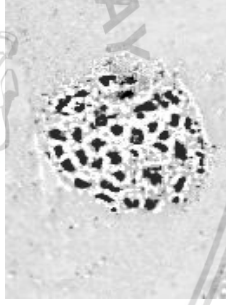

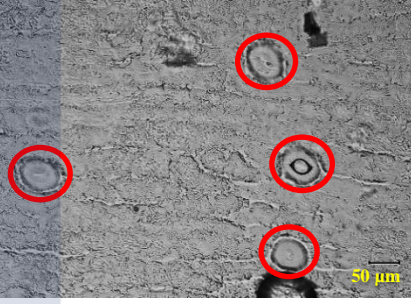
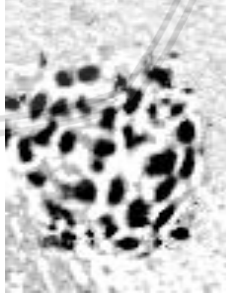

Perlakuan	Dok. Stomata	Data Stomata	Dok. Kromosom	Dok. Tanaman	Σ Kromosom
1500 ppm		Jumlah stomata : 3,67 Kerapatan : 18,68 mm ⁻² Panjang stomata : 69,85 μm Lebar stomata : 65μm			38
		Jumlah stomata : 3,67 Kerapatan : 18,68 mm ⁻² Panjang stomata : 70,38 μm Lebar stomata : 67,64 μm			43
		Jumlah stomata : 3,33 Kerapatan : 16,99 mm ⁻² Panjang stomata : 61,80 μm Lebar stomata : 54,94 μm			44

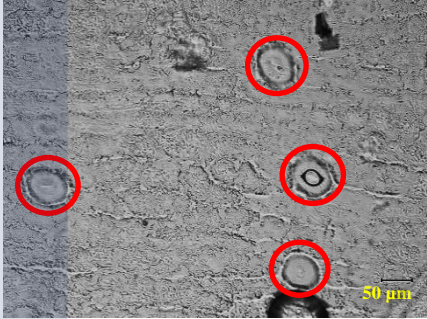
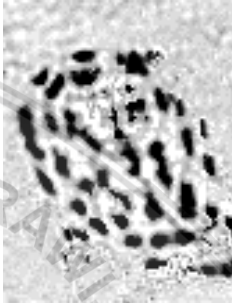

Perlakuan	Dok. Stomata	Data Stomata	Dok. Kromosom	Dok. Tanaman	Σ Kromosom
1500 ppm		Jumlah stomata : 4,33 Kerapatan : 22,08 mm ⁻² Panjang stomata : 64,83 µm Lebar stomata : 58,15 µm			38
3000 ppm		Jumlah stomata : 3,67 Kerapatan : 18,68 mm ⁻² Panjang stomata : 84,58 µm Lebar stomata : 69,09 µm			49
		Jumlah stomata : 2,67 Kerapatan : 13,59 mm ⁻² Panjang stomata : 64,03 µm Lebar stomata : 49,20 µm			52

Perlakuan	Dok. Stomata	Data Stomata	Dok. Kromosom	Dok. Tanaman	Σ Kromosom
3000 ppm		Jumlah stomata : 3,67 Kerapatan : 18,68 mm ⁻² Panjang stomata : 61,99 μm Lebar stomata : 61,99 μm			47
		Jumlah stomata : 3 Kerapatan : 15,29 mm ⁻² Panjang stomata : 65,53 μm Lebar stomata : 60,57 μm			41
		Jumlah stomata : 3,67 Kerapatan : 18,68 mm ⁻² Panjang stomata : 63,02 μm Lebar stomata : 63,02 μm			38

Perlakuan	Dok. Stomata	Data Stomata	Dok. Kromosom	Dok. Tanaman	Σ Kromosom
4500 ppm		Jumlah stomata : 3,67 Kerapatan : 18,68 mm ⁻² Panjang stomata : 64,49 µm Lebar stomata : 57,45 µm			43
		Jumlah stomata : 4 Kerapatan : 20,38 mm ⁻² Panjang stomata : 68,98 µm Lebar stomata : 61,21 µm			76
		Jumlah stomata : 2 Kerapatan : 10,19 mm ⁻² Panjang stomata : 65,41 µm Lebar stomata : 65,41 µm			42

Perlakuan	Dok. Stomata	Data Stomata	Dok. Kromosom	Dok. Tanaman	Σ Kromosom
4500 ppm		Jumlah stomata : 4,33 Kerapatan : 22,08 mm ⁻² Panjang stomata : 69,83 μm Lebar stomata : 64,15 μm			62
		Jumlah stomata : 3 Kerapatan : 15,29 mm ⁻² Panjang stomata : 75,26 μm Lebar stomata : 52,59 μm			70
6000 ppm		Jumlah stomata : 2,33 Kerapatan : 11,89 Panjang stomata : 58,08 μm Lebar stomata : 46,20 μm			41

Perlakuan	Dok. Stomata	Data Stomata	Dok. Kromosom	Dok. Tanaman	Σ Kromosom
6000 ppm		Jumlah stomata : 6 Kerapatan : 30,57 mm ⁻² Panjang stomata : 65,63 μm Lebar stomata : 62,97 μm			44
		Jumlah stomata : 3,33 Kerapatan : 16,99 mm ⁻² Panjang stomata : 70,84 μm Lebar stomata : 70,84 μm			50
		Jumlah stomata : 4,33 Kerapatan : 22,08 mm ⁻² Panjang stomata : 67,8 μm Lebar stomata : 61,67 μm			42

Perlakuan	Dok. Stomata	Data Stomata	Dok. Kromosom	Dok. Tanaman	Σ Kromosom
6000 ppm		Jumlah stomata : 3,67 Kerapatan : 18,68 mm ⁻² Panjang stomata : 65,34 μm Lebar stomata : 59,88 μm			40

4.1.4 Hasil Perhitungan Korelasi

Perhitungan korelasi dilakukan untuk mengetahui keeratan hubungan antara semua parameter terhadap parameter jumlah kromosom berkaitan dengan tingkat ploidi. Hasil nilai korelasi semua parameter terhadap jumlah kromosom disajikan pada Tabel 7.

Tabel 7. Nilai Korelasi Parameter Morfologi dan Stomata terhadap Jumlah Kromosom

No	Parameter Pengamatan	r
1	Umur Muncul Akar Baru	0,66
2	Jumlah Akar	-0,951
3	Panjang Akar	-0,573
4	Umur Muncul Daun Baru	0,3
5	Jumlah Daun	0,05
6	Panjang Daun	-0,671
7	Lebar Daun	0,35
8	Tebal Daun	0,242
9	Warna Daun	0,191
10	Panjang Tanaman	0,172
11	Jumlah Stomata	-0,573
12	Kerapatan Stomata	-0,574
13	Panjang Stomata	0,757
14	Lebar Stomata	0,669

Keterangan: * = Nyata pada taraf 5%

Berdasarkan tabel di atas, dapat diketahui bahwa parameter yang memiliki korelasi positif dengan jumlah kromosom antara lain umur muncul akar baru, umur muncul daun baru, jumlah daun, lebar daun, tebal daun, warna daun, panjang tanaman, panjang stomata dan lebar stomata. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan jumlah kromosom akan meningkatkan hasil parameter-parameter tersebut. Sedangkan, parameter yang memiliki korelasi negatif dengan jumlah kromosom yaitu jumlah akar, panjang akar, panjang daun, jumlah stomata, dan kerapatan stomata. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan jumlah kromosom akan disertai dengan penurunan dari parameter-parameter tersebut. Selain itu, parameter yang memiliki korelasi yang nyata dengan jumlah kromosom adalah jumlah akar baru.

4.2 Pembahasan

Identifikasi poliploid di penting dilakukan untuk mengetahui pengaruh aplikasi kolkisin terhadap tingkat ploidi tanaman. Identifikasi poliploidi dapat dilakukan dengan beberapa metode. Menurut Omezzine *et al.* (2012) poliploidi dapat diamati melalui parameter morfologi, sitologi, kimia dan fisiologi. Pengamatan tingkat ploidi dapat diamati dengan beberapa metode, salah satunya seperti pada penelitian ini. Pengamatan morfologi berperan memberikan informasi tentang pengaruh perlakuan terhadap fenotipe tanaman yang dapat ditampilkan melalui bentuk, ukuran, dan warna, sehingga tanaman terduga poliploidi dapat dibedakan dengan tanaman diploidnya. Namun, pengamatan ini sulit dilakukan apabila tanaman yang diamati memiliki pertumbuhan yang lambat, sehingga dibutuhkan waktu yang lama untuk melihat pengaruh dari segi morfologi. Oleh karena itu, penting dilakukan pengamatan stomata dan kromosom untuk mendukung pengamatan tingkat ploidi. Tingkat ploidi dapat diamati dengan membandingkan jumlah, ukuran, dan kerapatan stomata tanaman terduga poliploid dengan tanaman diploid. Namun, pengamatan ini tidak dapat mengetahui secara langsung tingkatan ploidy yang ada seperti triploid, tetraploid, dll, sehingga perlu dilengkapi dengan pengamatan kromosom.

Pengamatan kromosom dilakukan dengan mengamati jumlah kromosom yang ada pada sel tanaman terduga poliploidi. Tanaman poliploid memiliki jumlah kromosom lebih banyak dari kromosom diploidnya, sehingga melalui pengamatan kromosom dapat diketahui jumlah kromosom dan tingkat ploidi suatu tanaman. Pada penelitian ini, poliploidi diamati melalui parameter morfologi, stomata dan kromosom.

4.2.1 Pengaruh Kolkisin pada Parameter Morfologi Tanaman

a. Parameter umur muncul akar baru, jumlah akar dan panjang akar

Parameter morfologi berperan memberikan informasi tentang pengaruh perlakuan terhadap fenotipe tanaman. Parameter morfologi yang diamati meliputi jumlah akar, panjang akar, jumlah daun, panjang daun, lebar daun, tebal daun, warna daun dan panjang tanaman. Pada parameter umur muncul akar baru dan jumlah akar menunjukkan pengaruh yang

berbeda nyata pada konsentrasi 4500 ppm, dan tidak berbeda nyata pada konsentrasi lainnya. Sedangkan, pada parameter panjang akar, menunjukkan hasil yang berbeda nyata terhadap kontrol pada konsentrasi 6000 ppm dengan nilai t hitung 2,95. Dimana, rerata jumlah akar tertinggi dan panjang akar tertinggi terdapat pada perlakuan 0 ppm sebesar 1 helai dan 2,42 cm, sedangkan jumlah akar terendah terdapat pada perlakuan 4500 ppm sebesar 0,5 helai dan panjang akar terendah terdapat pada perlakuan 6000 ppm sebesar 1,105 cm.

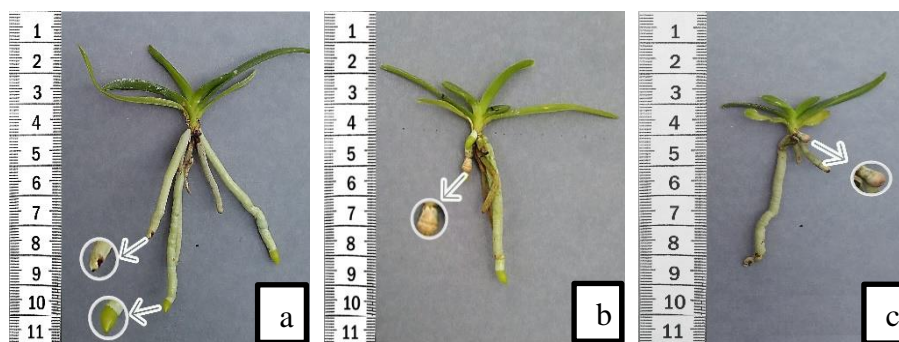
Hal ini menunjukkan bahwa tanaman yang diaplikasi kolkisin memiliki jumlah akar baru dan panjang akar baru lebih kecil dibandingkan tanaman kontrolnya, dan semakin tinggi konsentrasi maka jumlah akar dan panjang akar juga semakin rendah. Dengan kata lain, aplikasi kolkisin dapat menghambat pembentukan dan pertumbuhan akar. Hal ini sesuai dengan penelitian Tuwo dan Andriyanto (2016) pada protocorm *Vanda* Hibrida (*Vanda limbata* Blume X *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis*) yang diaplikasikan kolkisin, menunjukkan bahwa perlakuan kolkisin berpengaruh nyata pada jumlah akar, panjang akar, dan panjang daun. Dimana jumlah akar, panjang akar dan panjang daun lebih kecil dibandingkan kontrol. Pada penelitian Moghbel, Borujeni, dan Bernard (2015) menunjukkan bahwa tanaman yang diberi perlakuan kolkisin memiliki pertumbuhan yang lambat dibandingkan tanaman kontrol.

Adanya pengaruh yang nyata pada parameter umur muncul akar baru jumlah akar dan panjang akar menunjukkan bahwa diduga terdapat kontak langsung antara akar dan kolkisin. Meskipun aplikasi kolkisin dilakukan dengan cara ditetes pada titik tumbuh, tetapi peluang akar berinteraksi dengan kolkisin tetap ada, yaitu melalui tetesan kolkisin yang meresap ke ruas-ruas daun hingga ke pangkal akar. Hal ini dapat terjadi karena secara morfologi pola pertumbuhan *Vanda lombokensis* J. J. Sm adalah monopodial. Dimana pada pola pertumbuhan ini, anggrek tidak memiliki batang utama sehingga pangkal daun dengan pangkal akar langsung bertemu, berbeda dengan tipe pertumbuhan simpodial. Pada pola pertumbuhan simpodial, pangkal daun tidak bertemu langsung dengan

pangkal akar, melainkan dipisahkan oleh bulb, seperti pada anggrek *Dendrobium* dan *Cattleya*. Hal ini sesuai dengan Widyastoety dan Santi (2012) yang menyatakan bahwa pola pertumbuhan kelompok Vandaceous adalah monopodial dengan bentuk batang lurus, ramping, serta tidak berumbi. Sehingga apabila kolkisin diaplikasikan dengan cara ditetes pada titik tumbuh, maka peluang akar berinteraksi dengan kolkisin akan lebih besar pada anggrek dengan pola pertumbuhan monopodial seperti *Vanda lombokensis* J. J. Sm.

Meskipun kontak yang terjadi hanya melalui serapan atau rembesan kolkisin dari ruas daun ke pangkal akar, tetapi kontak tersebut dapat memberikan pengaruh yang nyata seperti yang ditunjukkan hasil analisis ragam pada jumlah akar dan Panjang akar. Hal ini dapat disebabkan karena bagian akar lebih sensitif terhadap pemberian perlakuan dibandingkan bagian tanaman yang lain. Hal ini sesuai dengan Syukur *et al.* (2013) yang menyatakan bahwa akar merupakan bagian tanaman yang sangat sensitif terhadap bahan kimia, sehingga aplikasi kolkisin sebaiknya tidak diberikan pada bagian akar.

Berdasarkan hal tersebut, apabila terjadi kontak antara bagian akar dengan kolkisin terutama pada konsentrasi yang tinggi, maka dapat menimbulkan pengaruh atau perbedaan dengan kondisi kontrolnya. Hal ini sesuai dengan hasil jumlah akar dan panjang jumlah akar perlakuan yang lebih rendah dibandingkan kontrolnya. Selain itu, hal ini didukung dengan adanya perbedaan bentuk ujung akar baru di beberapa tanaman yang diaplikasikan kolkisin pada konsentrasi 3000 ppm, 4500 ppm, dan 6000 ppm yang ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Bentuk Ujung Akar (a) Tanaman kontrol (b) Tanaman konsentrasi 3000 ppm (c) Tanaman pada konsentrasi 4500 ppm.

Perbedaan bentuk ujung akar terjadi pada perlakuan 3000 ppm sebanyak dua tanaman (10%), perlakuan 4500 ppm sebanyak tiga tanaman (15%), dan perlakuan 6000 ppm sebanyak satu tanaman (5%). Gambar 6a. menunjukkan bentuk ujung akar baru tanaman kontrol adalah runcing dengan bentuk ujung akar tua yaitu meruncing. Sedangkan pada gambar 6b dan 6c menunjukkan bentuk akar yang cenderung membulat dan tumpul. Bentuk ujung akar yang membulat ini muncul setelah seminggu setelah perlakuan, namun hanya bertahan kurang dari 5 hari. Setelah itu, ujung akar tersebut berwarna coklat dan tidak tumbuh memanjang seperti akar lainnya. Hal ini dapat menjadi salah satu bentuk pengaruh pemberian kolkisin terhadap akar bibit anggrek. Dimana aplikasi kolkisin pada konsentrasi tertentu dapat menimbulkan morfologi yang berbeda dari tanaman kontrol serta dapat menghambat pertumbuhan akar. Hal ini didukung Tuwo dan Andriyanto (2016) pada protocorm Vanda Hibrida (*Vanda limbata* Blume X *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis*) yang diaplikasikan kolkisin, menunjukkan bahwa perlakuan kolkisin berpengaruh nyata pada jumlah akar, panjang akar, dan panjang daun. Dimana jumlah akar, panjang akar dan panjang daun lebih kecil dibandingkan kontrol.

- b. Parameter umur muncul daun baru, jumlah daun, panjang daun, lebar daun, tebal daun, warna daun, dan panjang tanaman

Berdasarkan hasil T-Test menunjukkan bahwa konsentrasi 1500 ppm dan 4500 ppm berpengaruh nyata terhadap kontrol pada parameter jumlah daun, lebar daun dan tebal daun. Sedangkan pada konsentrasi 3000 ppm dan 6000 ppm menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata, begitu pula dengan pada parameter panjang daun, panjang tanaman yang tidak berbeda nyata pada semua konsentrasi. Sementara itu, warna daun pada semua konsentrasi didominasi oleh warna Cactus. Dibandingkan dengan hasil T-Test bagian akar, hasil T-Test bagian daun dan panjang tanaman lebih sedikit menunjukkan hasil yang berbeda nyata, sehingga hasilnya tidak jauh berbeda dengan kontrol. Hal ini dapat disebabkan karena bagian daun kurang sensitif terhadap bahan kimia dibandingkan dengan bagian akar, sehingga respon yang diberikan juga tidak selalu berbeda dari tanaman normalnya. Selain itu, tanaman anggrek merupakan jenis tanaman tahunan dengan pertumbuhan yang lambat terutama pada pertumbuhan daun, sehingga respon terhadap pemberian bahan kimia tidak selalu dimunculkan secara fenotipe. Hal ini sesuai dengan Widiastoety (2007) yang menyatakan bahwa anggrek merupakan tanaman yang lambat pertumbuhannya, sehingga dibutuhkan waktu yang relatif lama untuk mengamati pertumbuhannya.

Muncul tidaknya pengaruh kolkisin secara morfologi dapat dipengaruhi oleh banyaknya sel yang terpengaruh. Hal ini dikarenakan kolkisin hanya bekerja pada sel yang aktif membelah, sedangkan suatu bagian tanaman atau jaringan terdiri dari banyak sel, dimana sel-sel tersebut tidak membelah dalam waktu yang sama. Artinya, apabila kolkisin diberikan pada suatu bagian tanaman, maka sel-sel pada bagian tersebut tidak semuanya berinteraksi dengan kolkisin, melainkan hanya sel yang sedang aktif membelah. Dengan kata lain, sel yang berinteraksi dengan kolkisin tidak selalu dalam jumlah besar, hal ini dapat menyebabkan pengaruh kolkisin pada sel-sel tersebut tidak muncul secara morfologi karena sel normal lebih dominan dibandingkan sel yang

terpengaruh kolkisin (mutan). Hal ini seperti pada tanaman mixoploid, dimana suatu tanaman memiliki tingkat dua ploidi yang berbeda.

Omidbaigi *et al.* (2010b) menyatakan bahwa tanaman mixoploid merupakan tanaman yang memiliki dua tingkat ploidi (diploid dan tetraploid) di dalam jaringan yang sama, artinya penggandaan kromosom tidak terjadi pada semua sel dari jaringan yang diberi perlakuan. Hal ini juga didukung oleh Syukur *et al.* (2013) yang menyatakan bahwa mutasi baik spontan maupun buatan biasanya berbahaya dan sel-sel yang membawa sifat mutasi yang baru akan cenderung hilang dalam persaingan dengan sel-sel normalnya. Oleh karena itu, tidak munculnya pengaruh kolkisin secara morfologi dapat disebabkan karena jumlah sel normal yang mendominasi dibandingkan sel mutan.

4.2.2 Pengaruh Kolkisin pada Pengamatan Stomata Tanaman

Parameter stomata dapat digunakan sebagai indikator ploidi suatu tanaman dengan mengamati stomata yang ada, terutama pada penelitian ini karena pengamatan stomata dilakukan pada daun yang tumbuh setelah perlakuan, sehingga apabila terdapat perbedaan atau pengaruh maka disebabkan karena pemberian kolkisin. Wongpiyasatid *et al.* (2005) juga menyatakan bahwa panjang stomata adalah indikator yang akurat untuk menentukan ploidi suatu tanaman. Karakteristik stomata juga digunakan sebagai parameter untuk membedakan tingkat ploidi pada beberapa tanaman termasuk Iranian Endemic Mint *M. mozaffarianii* (Ghani *et al.*, 2014). Omidbaigi *et al.* (2010b) menyatakan bahwa karakteristik stomata penting sebagai indikator untuk mendeteksi tingkat ploidi yang baru di tanaman Dragonhead. Parameter yang diamati meliputi jumlah stomata, kerapatan stomata, panjang stomata dan lebar stomata.

Berdasarkan hasil T-Test menunjukkan bahwa parameter jumlah stomata dan kerapatan stomata berbeda nyata terhadap kontrol pada semua konsentrasi kolkisin. Dimana rerata jumlah dan kerapatan stomata tertinggi terdapat pada kontrol (5,93 dan 30,23 mm⁻²), sedangkan jumlah dan kerapatan stomata terendah terdapat pada konsentrasi 3000 ppm (3,33 dan 16,99 mm⁻²) yang diikuti konsentrasi 4500 ppm (3,4 dan 17,32 mm⁻²). Sementara itu, pada

parameter panjang stomata dan lebar stomata tidak berbeda nyata terhadap kontrol pada semua konsentrasi. Hal ini menunjukkan bahwa semakin banyak jumlah stomata, maka semakin tinggi kerapatan stomatanya dan semakin sedikit jumlah stomata, maka semakin rendah kerapatan stomatanya. Kerapatan stomata merupakan salah satu indikator tingkat ploidi. Dimana semakin rendah kerapatan stomatanya, maka peluang ploidinya semakin besar. Hal ini sesuai dengan Gantait *et al.* (2011) yang menyatakan bahwa induksi ploidi mengarah ke kerapatan stomata yang lebih rendah, kemungkinan karena stomata dan sel epidermis lebih besar. Penelitian Noori *et al.* (2017) juga menunjukkan bahwa kerapatan stomata pada tanaman *Trachyspermum ammi* L. tetraploid lebih rendah dibandingkan diploidnya.

Pada parameter panjang stomata dan lebar stomata, perlakuan dengan hasil tertinggi yaitu pada perlakuan 4500 ppm sebesar 68,79 μm dan 60,16 μm . Sedangkan, perlakuan dengan rerata panjang stomata dan lebar stomata terendah yaitu perlakuan 0 ppm sebesar 63,94 μm dan 54,99 μm . Hal ini menunjukkan bahwa ukuran stomata pada 0 ppm lebih kecil dibandingkan dengan ukuran stomata perlakuan. Omidbaigi *et al.* (2010b) menyatakan bahwa stomata dan sel penjaga tanaman diploid memiliki diameter lebih kecil dan panjang lebih kecil dibandingkan tanaman tetraploid. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar tingkat ploidi, maka semakin semakin besar ukuran stomatanya. Hasil penelitian Zhou, Zeng, dan Yan (2017) menunjukkan bahwa pada tanaman tetraploid, ukuran sel stomata meningkat dengan rata-rata panjang 33,4% dan lebar 37,8%. Peningkatan panjang dan lebar stomata juga terjadi pada tanaman *Trachyspermum ammi* L. yang diinduksi kolkisin (Noori *et al.*, 2017).

Meski memiliki ukuran stomata yang lebih besar dari kontrol, namun stomata perlakuan 4500 ppm belum termasuk poliploid. Hal ini dikarenakan, ukuran stomata perlakuan 4500 ppm $< 1,25 \times$ panjang stomata kontrol (kurang dari 79,89 μm). Russel (2004) menyatakan bahwa stomata perlakuan dengan panjang $> 1,25 \times$ panjang stomata kontrol diidentifikasi sebagai poliploidi. Sehingga meskipun ukuran stomata perlakuan 4500 ppm lebih besar dari kontrol, namun ukuran tersebut masih tergolong ukuran stomata

diploid. Hal ini juga didukung dengan T-Test yang menunjukkan hasil tidak berbeda nyata pada parameter panjang dan lebar stomata di semua konsentrasi kolkisin. Hasil penelitian Omidbaigi *et al.* (2010b) menunjukkan bahwa rata-rata panjang stomata diploid pada tanaman *Dracocephalum moldavica* L. yaitu 13,09 μm , sedangkan rata-rata panjang stomata tetraploid yaitu 19,97 μm ($> 1,25 \times$ panjang stomata kontrol, yaitu 16,36 μm).

Panjang stomata pada *Ocimum basilicum* L tetraploid juga $> 1,25 \times$ panjang stomata kontrol, yaitu 16,45 μm dengan panjang stomata kontrol 8,7 μm , bahkan pada penelitian ini panjang stomata tetraploid $2x$ panjang stomata diploid (Omidbaigi *et al.*, 2010a). Penelitian Miguel dan Leonhard (2011) pada beberapa jenis anggrek juga menunjukkan hal yang sama, bahwa panjang stomata pada PLBs anggrek *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Epidendrum*, *Odontioda*, dan *Phalaenopsis* $> 1,25 \times$ panjang stomata diploid atau kontrol).

4.2.3 Pengaruh Kolkisin pada Pengamatan Kromosom Tanaman

Pengaruh kolkisin pada akar perlu diamati secara sitologi, karena secara morfologi bagian akar menunjukkan respon terhadap pemberian kolkisin, baik pada parameter jumlah akar baru, panjang akar baru, maupun dari segi morfologi yaitu bentuk ujung akar baru. Induksi kolkisin pada tanaman dapat menyebabkan penggandaan kromosom, sehingga sel tanaman dapat memiliki kromosom lebih banyak dari diploidnya. Penggandaan kromosom terjadi ketika kromosom telah mengalami replikasi tanpa diikuti pembelahan sel. Salah satu mekanismenya adalah gagalnya pembentukan benang-benang gelendong, yang berfungsi menarik kromosom ke masing-masing kutub. Hal ini juga terjadi pada penggandaan kromosom melalui induksi kolkisin.

Mekanisme penggandaan kromosom akibat induksi kolkisin disebut C-Mitosis. Induksi kolkisin dapat menyebabkan terhambatnya pembentukan benang gelendong, sehingga menyebabkan gagalnya mitosis atau pembelahan sel, karena kromosom tidak tertarik ke masing-masing kutub pada saat anafase, sehingga pembelahan inti dan sel tidak terjadi, tetapi kromosom telah mengalami replikasi sehingga jumlahnya lebih dari diploidnya (Jansen, 1974 dalam Syukur *et al.*, 2013).

Berdasarkan T-Test menunjukkan hasil yang berbeda nyata pada parameter jumlah kromosom di konsentrasi 3000 ppm, 4500 ppm, dan 6000 ppm dengan rerata tertinggi terdapat pada konsentrasi 4500 ppm sebesar 58,6 kromosom. Selain itu, pada konsentrasi 4500 ppm juga terdapat tanaman yang diduga tetraploid berdasarkan pengamatan kromosom dengan jumlah 76 kromosom atau dengan presentase sebesar 5% dari total 20 tanaman. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan 4500 ppm lebih optimal untuk menghasilkan tanaman poliploid dibandingkan perlakuan lainnya. Hal ini didukung oleh penelitian Omidbaigi *et al.* (2010a) yang menunjukkan bahwa autotetraploid pada tanaman basil (*Ocimum basilicum*) dihasilkan oleh perlakuan pemberian kolkisin di titik tumbuh dengan konsentrasi 0,5%, dan paling efektif untuk menghasilkan autotetraploid. Selain itu, konsentrasi kolkisin 0,5% pada durasi 4 dan 8 jam memberikan hasil terbaik, dimana 39% dan 43% eksplan menghasilkan tanaman tetraploid (Aina *et al.*, 2012). Dibandingkan dengan perlakuan lain, maka perlakuan 4500 ppm diduga dapat menghasilkan tanaman poliploid dan paling mendekati dengan konsentrasi yang optimal seperti pada penelitian lainnya, yaitu 0,5% atau 5000 ppm.

4.2.4 Korelasi Jumlah Kromosom dengan Parameter Morfologi dan Stomata Tanaman

Perhitungan korelasi dilakukan untuk mengetahui keeratan hubungan antara semua parameter terhadap parameter jumlah kromosom berkaitan dengan tingkat ploidi. Korelasi yang terbentuk antar parameter bisa positif atau negatif. Semakin tinggi tingkat ploidi, maka parameter yang memiliki korelasi positif akan mengalami kenaikan, begitupula sebaliknya. Jika parameter morfologi maupun anatomi memiliki korelasi negatif terhadap jumlah kromosom, maka diduga terdapat pengaruh secara genetik atau faktor lain yang menyebabkan hal tersebut, seperti pada penelitian Aini, Mansyurdin, dan Suwirmen (2015), dimana peningkatan jumlah kromosom tidak diiringi dengan peningkatan parameter morfologi secara nyata dibandingkan tanaman kontrol, hal ini dapat disebabkan karena peningkatan jumlah kromosom di dalam inti sel memperlambat fase interfase sehingga proses pembelahan juga berlangsung lambat.

Berdasarkan data yang ada, dapat diketahui bahwa terdapat korelasi positif dan negatif pada parameter morfologi dan anatomi terhadap jumlah kromosom parameter yang memiliki korelasi positif dengan jumlah kromosom menunjukkan bahwa peningkatan jumlah kromosom akan meningkatkan hasil parameter-parameter tersebut. Omidbaigi *et al.* (2010b) menyatakan bahwa stomata dan sel penjaga tanaman diploid memiliki diameter lebih kecil dan panjang lebih kecil dibandingkan tanaman tetraploid. Sedangkan, parameter yang memiliki korelasi negatif dengan jumlah kromosom menunjukkan bahwa peningkatan jumlah kromosom akan disertai dengan penurunan dari parameter-parameter tersebut. Di beberapa spesies tanaman terdapat korelasi antara tingkat ploidi dan karakter sitogenetik seperti jumlah kloroplas di sel penjaga, ukuran stomata, kerapatan stomata dan diameter serbuk sari (Omezzine *et al.*, 2012). Pada penelitian Widoretno (2016) menunjukkan bahwa *Pogostemon cablin* Benth tetraploid memiliki rata-rata panjang dan lebar stomata lebih besar dibandingkan tanaman diploid, tetapi kerapatan stomatanya rendah.

Namun, berdasarkan data pengamatan yang ada. Hasil pengamatan stomata bertolakbelakang dengan hasil pengamatan jumlah kromosom. Dimana diketahui bahwa panjang stomata perlakuan 4500 ppm belum termasuk poliploid karena kurang dari 1,25 x panjang stomata kontrol. Tetapi berdasarkan perhitungan kromosom, pada perlakuan 4500 terdapat tanaman yang memiliki jumlah kromosom 76 atau disebut tetraploid. Sehingga, diduga tanaman tersebut tergolong mixoploid, dimana dalam satu jaringan atau tanaman terdapat dua tingkat ploidi yang berbeda, yaitu diploid dan tetraploid. Hal ini sesuai dengan Omidbaigi *et al.* (2010b) yang menyatakan bahwa tanaman mixoploid merupakan tanaman yang memiliki dua tingkat ploidi (diploid dan tetraploid) di dalam jaringan yang sama.

Hal ini didukung dengan hasil ukuran stomata yang menunjukkan bahwa ukuran stomata 4500 ppm lebih besar dibandingkan dengan kontrol, tetapi kurang dari 1,25 x Panjang stomata kontrol. Pada penelitian Omezzine *et al.* (2012) menunjukkan bahwa rata-rata panjang stomata diploid pada tanaman *Trigonella foenum-graecum* L. yaitu 13,20 μm , sedangkan

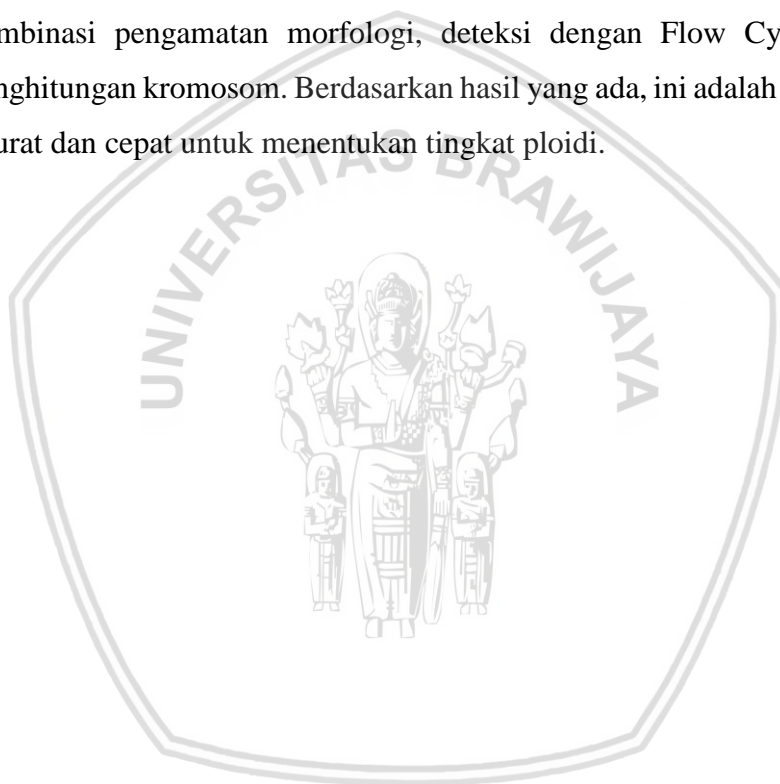
rata-rata panjang stomata mixoploid yaitu 14,83 μm . Artinya, ukuran stomata mixoploid lebih besar dibandingkan diploid, namun belum termasuk poliploid karena kurang dari 1,25 x panjang stomata diploid. Sehingga, diduga sel dengan kromosom diploid lebih dominan dibandingkan sel dengan kromosom tetraploid, sehingga dari ukuran stomata maupun morfologi tidak menunjukkan indikasi poliploid, namun dari segi jumlah kromosom, perlakuan 4500 ppm memiliki sel dengan kromosom tetraploid.

Sedikitnya jumlah sel poliploid (mutan) dibandingkan dengan sel normal (diploid) dapat disebabkan karena sel yang telah mengalami penggandaan jumlah kromosom (setelah fase M) tidak memasuki fase persiapan pembelahan sel (G1), tetapi keluar dari siklus pembelahan sel (G0), sehingga jumlah sel dengan kromosom poliploid (mutan) lebih sedikit. Mengingat fase G0 dapat berlangsung dalam waktu yang singkat bahkan lama. Syukur *et al.* (2013) menyatakan bahwa setelah melalui fase M, sel dapat memasuki fase G1 atau keluar dari siklus pembelahan sel (G0) bergantung sinyal dan kondisi lingkungan. Jika kondisi lingkungan tidak mendukung, maka sel dapat berhenti berprogres pada G1 dan memasuki kondisi G0 (G zero). G0 dapat berlangsung selama berhari-hari, bertahun-tahun, atau sampai sel mati. Selain itu, sedikitnya sel dengan kromosom mutan juga dapat disebabkan karena sel tersebut kalah bersaing dengan sel normal. Hal ini sesuai dengan Syukur *et al.* (2013) yang menyatakan bahwa mutasi baik spontan maupun buatan biasanya berbahaya dan sel-sel yang membawa sifat mutasi yang baru akan cenderung hilang dalam persaingan dengan sel-sel normalnya, sehingga jumlah sel normal lebih mendominasi.

Pengamatan tingkat ploidi melalui pengamatan jumlah kromosom memiliki kelemahan dalam pengamatan mixoploid. Hal ini dapat terjadi mengingat jaringan terdiri dari banyak sel (multisel) dan penggandaan kromosom hanya terjadi pada sel yang sedang aktif membelah pada saat perlakuan diberikan, sehingga kemungkinan adanya mixoploid juga besar dan akan sulit dimati jika diamati dengan menghitung jumlah kromosom. Hal ini sesuai dengan Uhlik, (1981) dalam Omidbaigi *et al.* (2010a) yang menyatakan bahwa menghitung kromosom lebih sulit dan membutuhkan

banyak waktu, selain itu metode ini tidak cocok untuk mendeteksi adanya mixoploid di dalam jaringan dengan membagi proporsi sel yang rendah seperti daun.

Berdasarkan hal di atas, penting adanya pengamatan ploidi menggunakan Flow Cytometry untuk mengetahui persebaran ploidi tanaman secara keseluruhan. Omidbaigi *et al.* (2010a) menyatakan bahwa untuk mengkonfirmasi ploidi level dari tanaman mixoploid dan tetraploid, maka diperlukan analisis dengan Flow Cytometry. Zhou *et al.* (2017) untuk menentukan tingkat ploidi bahan perlakuan, dapat dilakukan dengan kombinasi pengamatan morfologi, deteksi dengan Flow Cytometry dan penghitungan kromosom. Berdasarkan hasil yang ada, ini adalah metode yang akurat dan cepat untuk menentukan tingkat ploidi.



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil T-Test menunjukkan bahwa pemberian kolkisin berbeda nyata terhadap kontrol pada parameter umur muncul akar baru dan jumlah akar pada konsentrasi 4500 ppm serta parameter panjang akar berbeda nyata pada konsentrasi 6000 ppm. Selain itu, T-Test menunjukkan hasil yang berbeda nyata terhadap kontrol pada parameter jumlah daun, lebar daun, dan tebal daun di konsentrasi 1500 ppm dan 4500 ppm. Pada pengamatan stomata menunjukkan hasil yang berbeda nyata terhadap kontrol pada parameter jumlah stomata dan kerapatan stomata di semua konsentrasi kolkisin, tetapi tidak berbeda nyata pada panjang dan lebar stomata. Pada parameter jumlah kromosom menunjukkan hasil yang berbeda nyata terhadap kontrol pada konsentrasi 3000 ppm, 4500 ppm, dan 6000 ppm. Pada pengamatan kromosom di konsentrasi 4500 ppm terdapat tanaman dengan jumlah 76 kromosom (Tetraploid). Namun, berdasarkan pengamatan stomata, rerata panjang stomata pada konsentrasi 4500 ppm masih tergolong diploid karena $\leq 1,25 \times$ panjang stomata kontrol ($63,91 \mu\text{m}$) yaitu $79,89 \mu\text{m}$ dan hasil T-test panjang stomata tidak berbeda nyata terhadap kontrol. Sehingga, diduga tanaman tersebut termasuk mixoploid, dimana dalam satu jaringan atau tanaman memiliki dua tingkat ploidi yang berbeda, yaitu diploid dan tetraploid. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa perlakuan yang optimal untuk menghasilkan tanaman poliploid adalah 4500 ppm.

5.2 Saran

Konsentrasi 4500 ppm dapat menginduksi poliploidi pada anggrek *Vanda lombokensis* J. J. Sm. secara *in vivo*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, Zainal. 2017. *Vanda lombokensis* (Online). Available at <http://www.rv-orchidworks.com/orchidtalk/cattleyas-Vandas-dendrobiums-bloom/45811-Vanda-lombokensis.html>, accessed 28 Dec. 2017
- Aina O., K. Quesenberry, and M. Gallo. 2012. *In vitro* Induction of Tetraploids in *Arachis paraguariensis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult (PCTOC)* 111(2): 231–238
- Aini, H., Mansyurdin, dan Suwirmen. 2015. Induksi PLB Anggrek *Vanda sumatrana* Schltr. Liar Pada Media MS dengan Penambahan BAP dan NAA serta Poliploidisasi dengan Kolkisin. *J. Bio. UA* (4): 208-215
- Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. 2007. Prospek dan Arah Pengembangan Agribisnis Anggrek. Edisi Kedua. Departemen Pertanian Republik Indonesia, Jakarta
- Badan Pusat Statistik. 2016. Statistik Tanaman Hias Indonesia. Badan Pusat Statistik Indonesia
- Chen, W. H., C. Y. Tang and Y. L. Kao (2009). Ploidi Doubling by In Vitro Culture of Excised Protocorms or Protocorm-Like Bodies in *Phalaenopsis species*. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* (98): 229–238
- Dhooghe, E., K. Van Laere, T. Eeckhaut, L. Leus, and J. Van Huylenbroek. 2011. Mitotic Chromosome Doubling of Plant. Tissues in Vitro. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 104: 359–373.
- Dutta, S., A. Chowdhury, B. Bhattacharjee, P.K. Nath., and B.K. Dutta. 2011. “*In Vitro* Multiplication and rotocorm Development of *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) CEC Fisher”. *Biological and Environmental Sci* (7): 57-62
- Gallone, A., A. Hunter, and G. C. Douglas. Poliploidi Induction *In Vitro* using Colchicine and Oryzalin on Hebe ‘Oratia Beauty’: Production and Characterization of the Vegetative Traits. *Scientia Horticulturae* 179: 59-66
- Gantait, S., N. Mandal, S. Bhattacharyya, and P. K. Das. 2011. Induction and Identification of Tetraploids using *In Vitro* Colchicine Treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 106: 485–493
- Gardiner, L. M., A Koycan, M. Motes, D. L. Roberts, and B. C. Emerson. 2013. Molecular Phylogenetics of *Vanda* and Related Genera (*Orchidaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society* (173): 549–572
- Ghani A., SH. Neamati, M. Azizi, M. J. Saharkhiz, and M. Farsi. 2014. Artificial Autotetraploidi Induction Possibility of Two Iranian Endemic Mint (*Mentha mozaffarianii*) ecotypes. *Not Sci Biol* (6):185–191

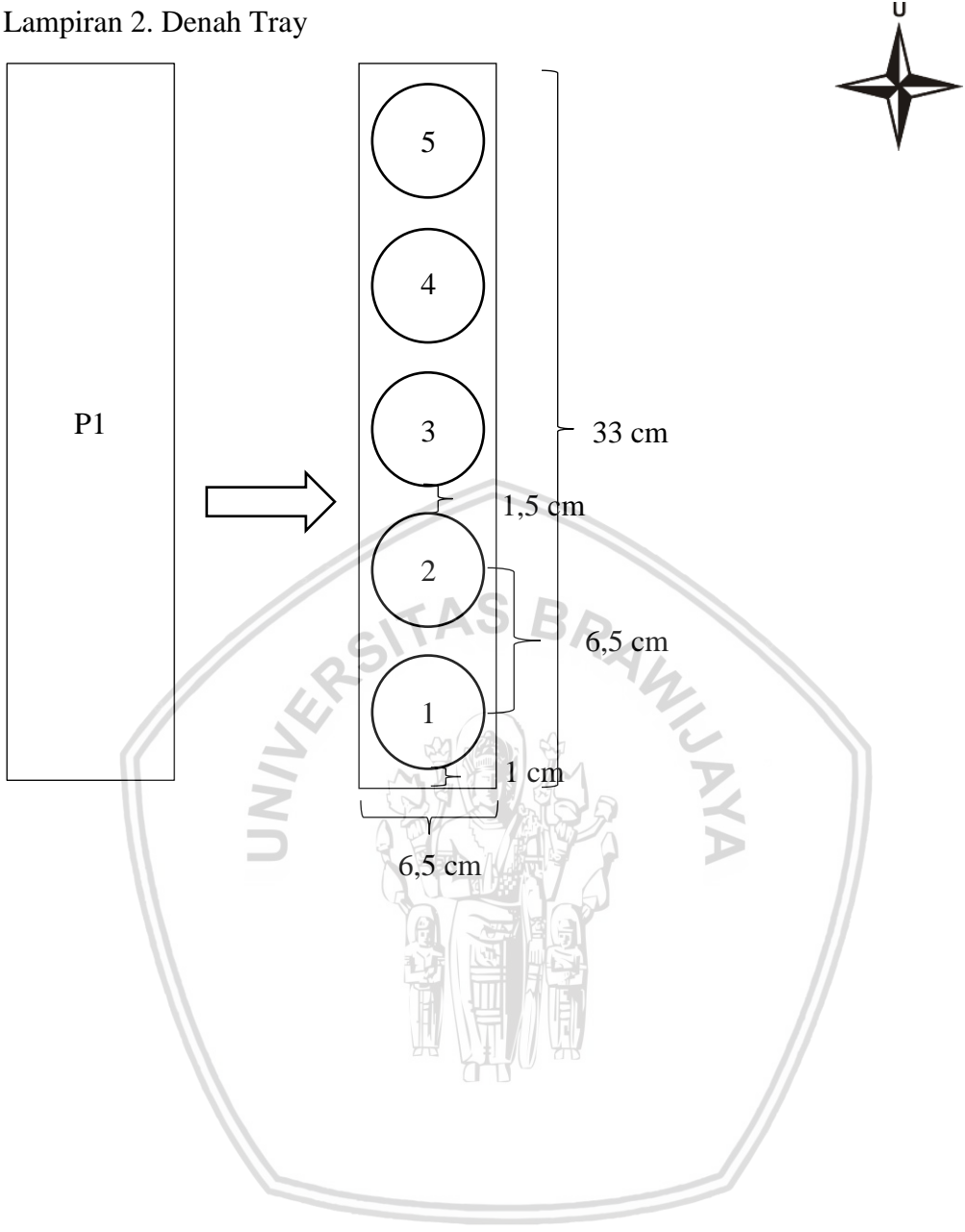
- Global Biodiversity Information Facility. (Online). Available at <https://www.gbif.org/species/136376095>, accessed November 2017
- Govaerts R. 2012. WCP: world checklist of monocotyledons. Kew: The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Published on the Internet. Available at: <http://www.kew.org/wcsp/monocots/>, accessed November 2017.
- He, Miao., W. Gao, Y. Gao, Y. Liu, X. Yang, H. Jiao, and Y. Zhou. 2016. Poliploidi Induced by Colchicine in *Dendranthema indicum* var. aromaticum, a scented *chrysanthemum*. J. Hortic. Sci. 81 (4); 219-226
- Hsiao Y.Y., M.F Jeng, W. C. Tsai, Y. C Chuang, C. Y. Li, C.S. Kuoh, W. H. Chen and H. H. Chen .2008. A novel Homodimeric Geranyl Diphosphate Synthase from the Orchid *Phalaenopsis bellina* lacking a DD (X)2-4D Motif. Plant J 55:719-733
- Jadrná, P., O. Plavcová, and F. Kobza. 2010. Morphological Changes in Colchicine-Treated Pelargonium × hortorum L.H. Bailey Greenhouse Plants. Horticultural Science (Prague) 37 (1): 27-33
- Journal Storage (JSTOR). 2000. (Online). Available at <http://plants.jstor.org/stable/10.5555/al.ap.specimen.10062527?searchUri=genus%3DVanda%26species%3Dlombokensis>, accessed November 2017
- Kerdsuwan, N and S. Te-chato. 2012. Effects of Colchicine on Survival Rate, Morphological, Physiological and Cytological Characters of Chang Daeng Orchid (*Rhynchostylis gigantea* var. rubrum Sagarik) In Vitro. Journal of Agricultural Technology Vol. 8 (4): 1451-1460.
- Ketmaro, S., T. Taychasinpitak, A. Mongkolchaiyaphruek and S. Wongchaochant. 2012. Effect of Colchicine on Increasing Pollen Viability in a Curcuma Hybrid (*Curcuma sparganifolia* × *C. parviflora*). Kasetsart J. (Nat. Sci.) 46: 363 – 370.
- Liu, G., Z. Li, and M. Bao. 2007. Colchicine Induced Chromosome Doubling in *Platanus acerifolia* and its Effect on Plant Morphology. Euphytica 157: 145–154.
- Miguel, T.P. and K.W. Leonhardt. 2011. In Vitro Polyploid Induction of Orchids using Oryzalin. Scientia Horticulturae 130: 314–319.
- Moghbel, N., M.K. Borujeni, and F. Bernard. 2015. Colchicine Effect on the DNA Content and Stomata Size of *Glycyrrhiza glabra* var. glandulifera and *Carthamus tinctorius* L. cultured in vitro. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 13: 1-6.
- Noori, S. A. S., M. Norouzi, G. Karimzadeh, K. Shirkoool, and M. Niazian. 2017. Effect of Colchicine-Induced Polyploidy on Morphological Characteristics and Essential Oil Composition of Ajowan (*Trachyspermum ammi* L.). Plant Cell Tiss Organ Cult 130: 543–551.

- Omezzine, F., A. Ladhari, F. Nefzi, R. Harrath, M. Aouni, and R. Haoula. 2012. Induction and Flow Cytometry Identification of Mixoploidi through Colchicine Treatment of *Trigonella foenum-graecum* L. African Journal of Biotechnology 11: 16434-16442.
- Omidbaigi, R., M. Mirzaee, M.E. Hassani, and M.S. Moghadam. 2010a. Induction and Identification of Poliploidi in Basil (*Ocimum basilicum* L.) Medicinal Plant by Colchicine Treatment. International Journal of Plant Production 4 (2): 87-98.
- Omidbaigi R, S. Yavari, M. E. Hassani, and S. Yavari. 2010b. Induction of Autotetraploidi in Dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) by Colchicine Treatments. J Fruit Ornamental Plant 18 (1): 23-35.
- Roberts, Jacqueline A., Lee R. Allman, S. Anuku, C. R. Beale, J. C. Benseler, J. Burdon, R. W. Butter, K. R. Crook, P. Mathew, H. N. McGough, A. Newman, and D. C. Zappi, 2002. CITES Orchid Checklist. The Royal Botanic Gardens Kew: CITES Secretariat. P: 405
- Russel, G. 2004. Stomatal Guard Cel Measurements using Leaf Prints. CSA J. 4: 137-139.
- Saranthum, S., M. Hegele, S. Tantivivat, and M. Nanakorn. 2010. Effect of Concentration and Duration of Colchicine Treatment on Poliploidi Induction in *Dendrobium scabrilingue* L. Europ. J. Hort. Sci. 75 (3): 123-127.
- Smith, Johannes Jacobu. 1925. *Vanda lombokensis* J.J. Sm. Published In: Meded. Herb. Leid. 53: 14. 1925. (Online). Available at <http://www.tropicos.org/Name/50030965>, accessed November 2017.
- Storme, N. De., and A. Mason. 2014. Plant Speciation through Chromosome Instability and Ploidi Change: Cellular Mechanisms, Molecular Factors and Evolutionary Relevance. Current Plant Biologi 1: 10-33.
- Sulistianingsih, R., Z. A. Suyanto, dan A.E. Noer. 2004. Peningkatan kualitas anggrek *Dendrobium* hibrida dengan Pemberian kolkhisin. Ilmu Pertanian 11 (1): 13-21.
- Suminah, Sutarno, dan A. D. Setyawan. 2002. Induksi Poliploidi Bawang Merah (*Allium ascalonicum* L.) dengan Pemberian Kolkisin. Biodiversitas, 3(1): 174-180.
- Suryani, R. 2015. Outlook Anggrek. Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian Sekretariat Jenderal Kementerian Pertanian 2015 (PUSLITHORTI).
- Syukur, M., S. Sastrosumarjo, Y. Wahyu, S. I. Aisyah, S. Sujiprihati, dan R. Yuniarti. 2013. Sitogenetika Tanaman (Edisi Kedua) Hal. 13; 127; 162. IPB Pres: Bogor.

- Tavan, M., M. H. Mirjalili¹, G. Karimzadeh. 2015. *In Vitro* Poliploidi Induction: Changes in Morphological, Anatomical and Phytochemical Characteristics of *Thymus persicus* (Lamiaceae). *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 122:573–583.
- Tuwo, M., A. Indrianto. 2016. Improvement of Orchid *Vanda* Hybrid (*Vanda limbata* Blume X *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis*) by Colchicines Treatment *In Vitro*. *Canadian Center of Science and Educatio*. 10 (11): 83-89.
- Widoretno, W. 2016. *In Vitro* Induction and Characterization of Tetraploid Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) Plant. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 125:261–267.
- Widiastoety, D. 2007. Pengaruh KNO₃ dan (NH₄)₂SO₄ terhadap Pertumbuhan Bibit Anggrek *Vanda*. *J. Hort*. 18(3): 307-311.
- Widyastoety, D. dan A. Santi. 2012. Keunggulan Kelompok Anggrek *Vanda* dalam Meningkatkan Variasi dan Kualitas Anggrek Bunga Potong. *Prosiding Seminar Anggrek 2012*. Balai Penelitian Tanaman Hias
- Wongpiyasatid, A., P. Hormchan, K. Chusreeaeom, dan N. Ratanadilok. 2005. Stomatal Size, Stomatal Frequency and Pollen Grain Diameter as Indirect Method for Identification of Ploidi Levels in Cotton. *Natural Science* 39: 552-559.
- Zhou, H. W., W.-dan Zeng, H-bing Yan. 2017. *In Vitro* Induction of Tetraploids in Cassava Variety ‘Xinxuan 048’ using Colchicine. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 128:723–729.

- P1 : Kolkisin 0 ppm (Kontrol)
P2 : Kolkisin 1500 ppm
P3 : Kolkisin 3000 ppm
P4 : Kolkisin 4500 ppm
P5 : Kolkisin 6000 ppm

Lampiran 2. Denah Tray



Lampiran 3. Perhitungan Kebutuhan kolkisin pada setiap perlakuan

- 1000 ppm = 1 g/L
- 1000 ppm = 1mg/mL
- 1500 ppm = 1,5 mg/mL
- Banyaknya ulangan setiap perlakuan adalah 5
- Jumlah tanaman setiap ulangan 5
- Total tanaman dalam satu perlakuan 5
- Banyaknya larutan kolkisin yang diaplikasikan pada setiap tanaman adalah 0,05 mL
- Banyaknya larutan yang dibutuhkan pada setiap perlakuan adalah

$$= 0,05 \text{ mL} \times 20 \text{ tanaman}$$

$$= 1 \text{ mL}$$
- Banyaknya larutan yang dibutuhkan pada setiap perlakuan untuk 3x aplikasi adalah

$$= 1,25 \text{ mL} \times 3$$

$$= 3 \text{ mL}$$
- Kebutuhan kolkisin pada setiap perlakuan

1. Konsentrasi 1500 ppm

Jika pada konsentrasi 1500 ppm yang dibutuhkan hanya 3 mL, maka banyaknya kolkisin yang dibutuhkan adalah

$$\frac{1,5 \text{ mg}}{1 \text{ mL}} = \frac{\text{mg}}{3 \text{ mL}}$$

$$\text{mg} = \frac{1,5 \text{ mg} \cdot 3 \text{ mL}}{1 \text{ mL}}$$

Kolkisin= 4,5 mg/perlakuan

2. . Konsentrasi 3000 ppm

Jika pada konsentrasi 3000 ppm yang dibutuhkan hanya 3 mL, maka banyaknya kolkisin yang dibutuhkan adalah

$$\frac{3 \text{ mg}}{1 \text{ mL}} = \frac{\text{mg}}{3 \text{ mL}}$$

$$\text{mg} = \frac{3 \text{ mg} \cdot 3 \text{ mL}}{1 \text{ mL}}$$

Kolkisin= 9 mg/perlakuan

3. Konsentrasi 4500 ppm

Jika pada konsentrasi 4500 ppm yang dibutuhkan hanya 3 mL, maka banyaknya kolkisin yang dibutuhkan adalah

$$\frac{4,5 \text{ mg}}{1 \text{ mL}} = \frac{\text{mg}}{3 \text{ mL}}$$
$$\text{mg} = \frac{1,5 \text{ mg} \cdot 3 \text{ mL}}{1 \text{ mL}}$$

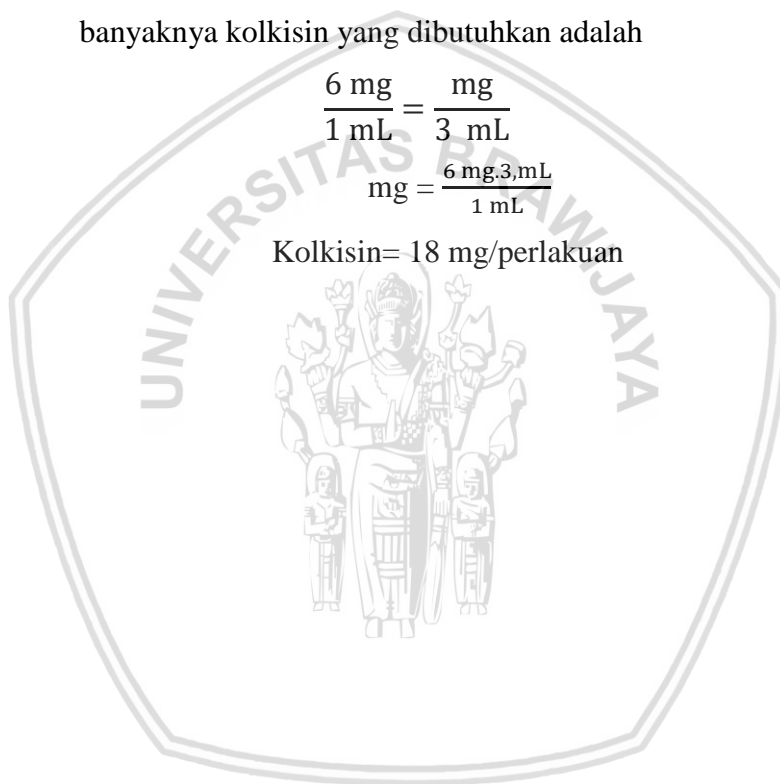
Kolkisin= 13,5 mg/perlakuan

4. Konsentrasi 6000 ppm

Jika pada konsentrasi 6000 ppm yang dibutuhkan hanya 3 mL, maka banyaknya kolkisin yang dibutuhkan adalah

$$\frac{6 \text{ mg}}{1 \text{ mL}} = \frac{\text{mg}}{3 \text{ mL}}$$
$$\text{mg} = \frac{6 \text{ mg} \cdot 3 \text{ mL}}{1 \text{ mL}}$$

Kolkisin= 18 mg/perlakuan



Lampiran 4. Deskripsi tanaman *Vanda lombokensis* J.J. Sm.

Tipe pertumbuhan	: Monopodial
Letak bunga	: Lateral (di ketiak daun)
Bentuk bunga	: Bintang
Bentuk sepal	: Bulat telur sungsang
Bentuk petal	: Bulat telur sungsang
Bentuk ujung sepal dan petal	: Bergigi tiga
Warna dasar bunga	: Kuning, putih, dan campuran kuning dan putih
Warna lip	: Kuning, putih dan pink
Ukuran bunga	: 4-5 cm
Bentuk daun	: Pita/lurus
Bentuk ujung daun	: Berujung suntih dangkal bertulang runcing
Susunan daun	: Rangkap
Pertumbuhan tajuk	: Indeterminate (tidak terbatas)
Letak akar	: Adventif (di antara buku-buku)
Tipe perakaran	: Akar udara
Anakan	: Tidak terbentuk anakan
Panjang tanaman	: 20 cm-2m

(Widyastoety dan Santi, 2012; Gardiner *et al.*, 2013)

Lampiran 5. Tabel T-Test pada beberapa konsentrasi kolkisin

Umur Muncul Akar Baru Perlakuan Terhadap Kontrol (P1)

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances

	P1	P2
Mean	20,75	20,20
Variance	278,41	236,69
Observations	20,00	20,00
df	38,00	
t Stat	0,11	
P(T<=t) two-tail	0,91	
t Critical two-tail	2,02	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances

	P1	P3
Mean	20,75	17,45
Variance	278,41	410,26
Observations	20,00	20,00
df	37,00	
t Stat	0,56	
P(T<=t) two-tail	0,58	
t Critical two-tail	2,03	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances

	P1	P4
Mean	20,75	8,30
Variance	278,41	123,27
Observations	20,00	20,00
df	33,00	
t Stat	2,78	
P(T<=t) two-tail	0,01	
t Critical two-tail	2,03	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances

	P1	P5
Mean	20,75	20,60
Variance	278,41	542,36
Observations	20,00	20,00
df	34,00	
t Stat	0,02	
P(T<=t) two-tail	0,98	
t Critical two-tail	2,03	

Jumlah Akar Perlakuan Terhadap Kontrol (P1)

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances

	P1	P2
Mean	1,00	0,95
Variance	0,21	0,37
Observations	20,00	20,00
df	35,00	
t Stat	0,29	
P(T<=t) two-tail	0,77	
t Critical two-tail	2,03	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances

	P1	P3
Mean	1,00	0,75
Variance	0,21	0,30
Observations	20,00	20,00
df	37,00	
t Stat	1,56	
P(T<=t) two-tail	0,13	
t Critical two-tail	2,03	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances

	P1	P4
Mean	1	0,5
Variance	0,21	0,26
Observations	20,00	20,00
df	38,00	
t Stat	3,25	
P(T<=t) two-tail	0,00	
t Critical two-tail	2,02	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances

	P1	P5
Mean	1	0,75
Variance	0,21	0,51
Observations	20,00	20,00
df	32,00	
t Stat	1,31	
P(T<=t) two-tail	0,20	
t Critical two-tail	2,04	

Panjang Akar Perlakuan Terhadap Kontrol (P1)

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P2
Mean	2,42	1,64
Variance	2,17	1,96
Observations	20,00	20,00
df	38,00	
t Stat	1,71	
P(T<=t) two-tail	0,10	
t Critical two-tail	2,02	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P3
Mean	2,42	1,47
Variance	2,17	2,59
Observations	20,00	20,00
df	38,00	
t Stat	1,94	
P(T<=t) two-tail	0,06	
t Critical two-tail	2,02	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P4
Mean	2,42	1,54
Variance	2,17	2,81
Observations	20,00	20,00
df	37,00	
t Stat	1,75	
P(T<=t) two-tail	0,09	
t Critical two-tail	2,03	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P5
Mean	2,42	1,11
Variance	2,17	1,77
Observations	20,00	20,00
df	38,00	
t Stat	2,95	
P(T<=t) two-tail	0,01	
t Critical two-tail	2,02	

Umur Muncul Daun Baru Perlakuan Terhadap Kontrol (P1)

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P2
Mean	19,30	29,90
Variance	373,59	390,41
Observations	20,00	20,00
df	38,00	
t Stat	-1,72	
P(T<=t) two-tail	0,09	
t Critical two-tail	2,02	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P3
Mean	19,30	21,35
Variance	373,59	328,77
Observations	20,00	20,00
df	38,00	
t Stat	-0,35	
P(T<=t) two-tail	0,73	
t Critical two-tail	2,02	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P4
Mean	19,30	28,60
Variance	373,59	233,73
Observations	20,00	20,00
df	36,00	
t Stat	-1,69	
P(T<=t) two-tail	0,10	
t Critical two-tail	2,03	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P5
Mean	19,30	25,35
Variance	373,59	468,34
Observations	20,00	20,00
df	38,00	
t Stat	-0,93	
P(T<=t) two-tail	0,36	
t Critical two-tail	2,02	

Jumlah Daun Perlakuan Terhadap Kontrol (P1)

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P2
Mean	0,75	1,20
Variance	0,30	0,27
Observations	20,00	20,00
df	38,00	
t Stat	-2,65	
P(T<=t) two-tail	0,01	
t Critical two-tail	2,02	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P3
Mean	0,75	0,90
Variance	0,30	0,31
Observations	20,00	20,00
df	38,00	
t Stat	-0,86	
P(T<=t) two-tail	0,39	
t Critical two-tail	2,02	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P4
Mean	0,75	1,00
Variance	0,30	0,11
Observations	20,00	20,00
df	31,00	
t Stat	-1,75	
P(T<=t) two-tail	0,09	
t Critical two-tail	2,04	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P5
Mean	0,75	0,80
Variance	0,30	0,17
Observations	20,00	20,00
df	35,00	
t Stat	-0,33	
P(T<=t) two-tail	0,75	
t Critical two-tail	2,03	

Panjang Daun Perlakuan Terhadap Kontrol (P1)

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P2
Mean	1,16	1,60
Variance	1,10	0,52
Observations	20,00	20,00
df	34,00	
t Stat	-1,53	
P(T<=t) two-tail	0,14	
t Critical two-tail	2,03	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P3
Mean	1,16	1,07
Variance	1,10	0,72
Observations	20,00	20,00
df	36,00	
t Stat	0,31	
P(T<=t) two-tail	0,75	
t Critical two-tail	2,03	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P4
Mean	1,16	1,38
Variance	1,10	0,52
Observations	20,00	20,00
df	34,00	
t Stat	-0,77	
P(T<=t) two-tail	0,45	
t Critical two-tail	2,03	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P5
Mean	1,16	1,70
Variance	1,10	4,61
Observations	20,00	20,00
df	28,00	
t Stat	-1,00	
P(T<=t) two-tail	0,33	
t Critical two-tail	2,05	

Lebar Daun Perlakuan Terhadap Kontrol (P1)

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P2
Mean	0,41	0,61
Variance	0,08	0,05
Observations	20,00	20,00
df	35,00	
t Stat	-2,64	
P(T<=t) two-tail	0,01	
t Critical two-tail	2,03	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P3
Mean	0,41	0,45
Variance	0,08	0,07
Observations	20,00	20,00
df	38,00	
t Stat	-0,50	
P(T<=t) two-tail	0,62	
t Critical two-tail	2,02	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P4
Mean	0,41	0,61
Variance	0,08	0,05
Observations	20,00	20,00
df	35,00	
t Stat	-2,61	
P(T<=t) two-tail	0,45	
t Critical two-tail	2,03	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P5
Mean	0,41	0,50
Variance	0,08	0,10
Observations	20,00	20,00
df	37,00	
t Stat	-0,95	
P(T<=t) two-tail	0,35	
t Critical two-tail	2,03	

Tebal Daun Perlakuan Terhadap Kontrol (P1)

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P2
Mean	0,09	0,13
Variance	0,00	0,00
Observations	20,00	20,00
df	-2,58	
t Stat	0,01	
P(T<=t) two-tail	0,01	
t Critical two-tail	2,04	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P3
Mean	0,09	0,10
Variance	0,00	0,00
Observations	20,00	20,00
df	38,00	
t Stat	-0,63	
P(T<=t) two-tail	0,53	
t Critical two-tail	2,02	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P4
Mean	0,09	0,12
Variance	0,00	0,00
Observations	20,00	20,00
df	32,00	
t Stat	-2,32	
P(T<=t) two-tail	0,03	
t Critical two-tail	2,04	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P5
Mean	0,09	0,09
Variance	0,00	0,00
Observations	20,00	20,00
df	38,00	
t Stat	-0,30	
P(T<=t) two-tail	0,76	
t Critical two-tail	2,02	

Panjang Tanaman Perlakuan Terhadap Kontrol (P1)

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P2
Mean	3,71	4,01
Variance	1,13	2,18
Observations	20,00	20,00
df	35,00	
t Stat	-0,73	
P(T<=t) two-tail	0,47	
t Critical two-tail	2,03	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P3
Mean	3,71	3,55
Variance	1,13	0,95
Observations	20,00	20,00
df	38,00	
t Stat	0,50	
P(T<=t) two-tail	0,62	
t Critical two-tail	2,02	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P4
Mean	3,71	4,32
Variance	1,13	1,87
Observations	20,00	20,00
df	36,00	
t Stat	-1,56	
P(T<=t) two-tail	0,13	
t Critical two-tail	2,03	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P5
Mean	3,71	4,00
Variance	1,13	6,47
Observations	20,00	20,00
df	25,00	
t Stat	-0,46	
P(T<=t) two-tail	0,65	
t Critical two-tail	2,06	

Jumlah Stomata Perlakuan Terhadap Kontrol (P1)

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P2
Mean	5,93	3,73
Variance	0,47	0,19
Observations	5,00	5,00
df	7,00	
t Stat	6,08	
P(T<=t) two-tail	0,00	
t Critical two-tail	2,36	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P3
Mean	5,93	3,33
Variance	0,47	0,22
Observations	5,00	5,00
df	7,00	
t Stat	7,00	
P(T<=t) two-tail	0,00	
t Critical two-tail	2,36	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P4
Mean	5,93	3,40
Variance	0,47	0,86
Observations	5,00	5,00
df	7,00	
t Stat	4,93	
P(T<=t) two-tail	0,00	
t Critical two-tail	2,36	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P5
Mean	5,93	3,93
Variance	0,47	1,86
Observations	5,00	5,00
df	6,00	
t Stat	2,93	
P(T<=t) two-tail	0,03	
t Critical two-tail	2,45	

Kerapatan Stomata Perlakuan Terhadap Kontrol (P1)

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	<i>P1</i>	<i>P2</i>
Mean	30,23	19,02
Variance	12,12	4,90
Observations	5,00	5,00
df	7,00	
t Stat	6,08	
P(T<=t) two-tail	0,00	
t Critical two-tail	2,36	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	<i>P1</i>	<i>P3</i>
Mean	30,23	16,99
Variance	12,12	5,77
Observations	5,00	5,00
df	7,00	
t Stat	7,00	
P(T<=t) two-tail	0,00	
t Critical two-tail	2,36	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	<i>P1</i>	<i>P4</i>
Mean	30,23	17,32
Variance	12,12	22,21
Observations	5,00	5,00
df	7,00	
t Stat	4,93	
P(T<=t) two-tail	0,00	
t Critical two-tail	2,36	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	<i>P1</i>	<i>P5</i>
Mean	30,23	20,04
Variance	12,12	48,18
Observations	5,00	5,00
df	6,00	
t Stat	2,93	
P(T<=t) two-tail	0,03	
t Critical two-tail	2,45	

Panjang Stomata Perlakuan Terhadap Kontrol (P1)

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	<i>P1</i>	<i>P2</i>
Mean	63,95	67,34
Variance	31,74	14,69
Observations	5,00	5,00
df	7,00	
t Stat	-1,11	
P(T<=t) two-tail	0,30	
t Critical two-tail	2,36	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	<i>P1</i>	<i>P3</i>
Mean	63,95	67,83
Variance	31,74	89,38
Observations	5,00	5,00
df	7,00	
t Stat	-0,79	
P(T<=t) two-tail	0,46	
t Critical two-tail	2,36	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	<i>P1</i>	<i>P4</i>
Mean	63,95	68,79
Variance	31,74	18,22
Observations	5,00	5,00
df	7,00	
t Stat	-1,53	
P(T<=t) two-tail	0,17	
t Critical two-tail	2,36	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	<i>P1</i>	<i>P5</i>
Mean	63,95	65,54
Variance	31,74	22,20
Observations	5,00	5,00
df	8,00	
t Stat	-0,48	
P(T<=t) two-tail	0,64	
t Critical two-tail	2,31	

Lebar Stomata Perlakuan Terhadap Kontrol (P1)

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P2
Mean	54,99	58,46
Variance	35,20	70,28
Observations	5,00	5,00
df	7,00	
t Stat	-0,75	
P(T<=t) two-tail	0,48	
t Critical two-tail	2,36	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P3
Mean	54,99	60,39
Variance	35,20	53,40
Observations	5,00	5,00
df	8,00	
t Stat	-1,28	
P(T<=t) two-tail	0,24	
t Critical two-tail	2,31	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P4
Mean	63,95	68,79
Variance	31,74	18,22
Observations	5,00	5,00
df	8,00	
t Stat	-1,46	
P(T<=t) two-tail	0,18	
t Critical two-tail	2,31	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P5
Mean	54,99	60,31
Variance	35,20	79,78
Observations	5,00	5,00
df	7,00	
t Stat	-1,11	
P(T<=t) two-tail	0,30	
t Critical two-tail	2,36	

Jumlah Kromosom Perlakuan Terhadap Kontrol (P1)

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P2
Mean	38,00	40,20
Variance	0,00	9,20
Observations	5,00	5,00
df	4,00	
t Stat	-0,75	
P(T<=t) two-tail	0,18	
t Critical two-tail	2,78	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P3
Mean	38,00	45,40
Variance	0,00	33,30
Observations	5,00	5,00
df	4,00	
t Stat	-2,87	
P(T<=t) two-tail	0,05	
t Critical two-tail	2,78	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P4
Mean	38,00	58,60
Variance	0,00	240,8
Observations	5,00	5,00
df	4,00	
t Stat	-2,97	
P(T<=t) two-tail	0,04	
t Critical two-tail	2,78	

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	P1	P5
Mean	38,00	43,40
Variance	0,00	15,80
Observations	5,00	5,00
df	4,00	
t Stat	-3,04	
P(T<=t) two-tail	0,04	
t Critical two-tail	2,78	

Tabel 20. Pengamatan kromosom

Perlakuan	Euploid ($x=19$ kromosom)			Aneuploid
	Diploid (2x)	Triploid (3x)	Tetraploid (4x)	
0 ppm	5	-	-	-
1500 ppm	3	-	-	2
3000 ppm	1	-	-	4
45000 ppm	-	-	1	4
6000 ppm	-	-	-	5

